



**ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ**  
**Σχολή Χημικών Μηχανικών**  
**Τομέας IV: Σύνθεσης & Ανάπτυξης Βιομηχανικών**  
**Διαδικασιών**  
**Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας**

Αύξηση της παραγωγής ανασυνδυασμένων  
ημικυτταρινασών του *Fusarium oxysporum* στην  
μεθυλότρωση ζύμη *Pichia pastoris*

**ΜΑΛΑΜΟΥ ΣΤΥΛΙΑΝΗ**  
**Επιβλέπων: Τόπακας Ευάγγελος**  
**Αθήνα 2015**

## **ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

<b><u>Περίληψη</u></b> .....	5
<b><u>Abstract</u></b> .....	6
<b><u>Κεφάλαιο 1<sup>ο</sup> : Εισαγωγή και Σκοπός</u></b>	
1. Εισαγωγή .....	7
1.1. Δομή της ημικυτταρίνης .....	7
1.1.1. Χημικές ιδιότητες .....	8
1.1.2. Ξυλάνη .....	10
1.1.3. Ξυλανάσες .....	13
1.1.3.1. Κατηγοριοποίηση των ξυλανασών .....	15
1.1.4. Εστεράσες του φερουλικού οξέος .....	18
1.1.4.1. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των εστερασών του φερουλικού οξέος .....	20
1.1.5. Συνεργισμός ενζύμων .....	22
1.1.6. Εφαρμογές ξυλανασών – εστερασών .....	22
1.1.6.1. Ξυλανάσες .....	22
1.1.6.1.1. Οι ξυλανάσες στη ζωική τροφή .....	23
1.1.6.1.2. Κατασκευή του ψωμιού, των τροφίμων και των ποτών .....	24
1.1.6.1.3. Φαρμακευτικές και χημικές εφαρμογές .....	25
1.1.6.1.4. Κλωστοϋφαντουργικά προϊόντα .....	26
1.1.6.1.5. Πολτός και χαρτί κυτταρίνης .....	27
1.1.6.2. Εστεράσες .....	31
1.1.6.2.1. Απελευθέρωση φερουλικού οξέος .....	31
1.1.6.2.2. Βιομηχανία χάρτου .....	32
1.1.6.2.3. Παραγωγή βιοαιθανόλης .....	33
1.1.6.2.4. Αγροτικές βιομηχανίες .....	34

1.1.6.2.5. Βελτιωτικά άρτου .....	35
1.1.6.2.6. Βιοσυνθετικά εργαλεία .....	35
2. Σκοπός .....	36

## **Κεφάλαιο 2<sup>ο</sup> : Υλικά και Μέθοδοι & Μοριακές Τεχνικές**

2.1. Υλικά .....	36
2.1.1. Μικροοργανισμοί .....	36
2.1.2. Αντιδραστήρια – Αναλώσιμα υλικά .....	37
2.1.3. Υλικά και στήλες Χρωματογραφίας .....	37
2.1.4. Θρεπτικά μέσα – Ρυθμιστικά διαλύματα .....	37
2.1.5. Ολιγονουκλεοτίδια .....	39
2.1.6. Πλασμιδιακοί φορείς κλωνοποίησης και έκφρασης .....	40
2.2. Καλλιέργειες κυττάρων .....	41
2.2.1. Υγρές και στερεές καλλιέργειες βακτηριακών κυττάρων <i>E.coli</i> .....	41
2.2.2. Υγρές και στερεές καλλιέργειες κυττάρων του ζυμομύκητα <i>Pichia pastoris</i> .....	42
2.3. Μοριακές τεχνικές .....	43
2.3.1. Κλωνοποίηση – Υπερέκφραση .....	43
2.3.1.1. Απομόνωση DNA από το μικροοργανισμό <i>Fusarium oxysporum</i> .....	43
2.3.1.2. PCR - (Polymerase Chain Reaction) .....	43
2.3.1.3. Πήκτωμα αгарόζης – Ηλεκτροφόρηση .....	45
2.3.1.4. Διαδικασία κλωνοποίησης τμήματος DNA .....	46
α) Αντίδραση λιγάσης .....	46
β) Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων <i>E. Coli</i> .....	47
γ) Επιλογή αποικιών.....	48
δ) Πέψη .....	50

2.3.1.5. Απομάκρυνση εσωνίου .....	50
2.3.1.6. Μεταφορά στο πλασμίδιο pPICZαC της Invitrogen .....	51
α) Αντίδραση λιγάσης στο pPICZαC .....	51
β) Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων <i>E. Coli</i> .....	51
γ) Επιλογή αποικιών .....	52
δ) Πέψη .....	52
2.3.2. Υπερέκφραση του γονιδίου .....	52
2.3.2.1. Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE .....	54

### **Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup> : ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

3.1. Βελτιστοποίηση της παραγωγής της ενδο-1,4-β-ξυλανάσης FoXyn11-09638 από το ζυμομύκητα <i>P. pastoris</i> .....	56
3.1.1. Πείραμα 1 <sup>ο</sup> : Ρυθμιστικά διαλύματα με διαφορετικό pH (5 - 10) .....	56
3.1.2. Πείραμα 2 <sup>ο</sup> : Διαφορετικές συγκεντρώσεις μεθανόλης (0.50 – 3.00 %) .....	57
3.1.3. Πείραμα 3 <sup>ο</sup> : Διαφορετικός ρυθμός ανάδευσης (0 – 250 rpm) .....	58
3.1.4. Πείραμα 4 <sup>ο</sup> : Κωνικές φιάλες με διαφορετικές εκγοπές (καμία, 2, 4 και 6) .....	59
3.2. Βελτιστοποίηση της παραγωγής της εστεράσης του φερουλικού οξέος FoFaeC-12213 από το ζυμομύκητα <i>P. Pastoris</i> .....	60
3.2.1. Πείραμα 1 <sup>ο</sup> : Ρυθμιστικά διαλύματα με διαφορετικό pH (5 - 10) .....	61
3.2.2. Πείραμα 2 <sup>ο</sup> : Διαφορετικές συγκεντρώσεις μεθανόλης (0.50 – 3.00 %) .....	61
3.2.3. Πείραμα 3 <sup>ο</sup> : Διαφορετικός ρυθμός ανάδευσης (0 – 250 rpm) .....	62
3.2.4. Πείραμα 4 <sup>ο</sup> : Κωνικές φιάλες με διαφορετικές εκγοπές (καμία, 2, 4 και 6) .....	63
<b><u>Κεφάλαιο 4<sup>ο</sup> : Συμπεράσματα</u></b> .....	65
<b><u>Κεφάλαιο 5<sup>ο</sup> : Βιβλιογραφία</u></b> .....	67

## Περίληψη

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση και ετερόλογη υπερέκφραση στο μεθυλότροφο μύκητα *Pichia pastoris* X33 της ξυλανάσης οικογένειας 11, (FoXyn11-09638) από τον μικροοργανισμό *Fusarium oxysporum*. Το ώριμο γονίδιο της ξυλανάσης, το οποίο παράχθηκε μετά την αποκοπή ενός εσωνίου μεταφέρθηκε στο πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pPICZaC. Το γονίδιο με την τελική του δομή ενσωματώθηκε στο γονιδίωμα του μεθυλοτροφικού ζυμομύκητα *P. pastoris* X33 και αξιολογήθηκε η δυνατότητα παραγωγής ενεργότητας της ξυλανάσης σε καλλιέργειες μικρής κλίμακας σε κωνικές φιάλες. Αποτελεσματικά εκκρίθηκε η ξυλανάση στα ανασυνδυασμένα κύτταρα της ζύμης *P. pastoris* και έπειτα από προσθήκη μεθανόλης παρατηρήθηκε υψηλό επίπεδο ενζυματικής παραγωγής (110 U/mL) μετά από 216 h επώασης. Προκειμένου να αυξηθεί η παραγωγή της ξυλανάσης βελτιστοποιήθηκαν οι συνθήκες ζύμωσης, δηλαδή το αρχικό pH θρεπτικού μέσου, η ταχύτητα ανάδευσης, η συγκέντρωση μεθανόλης και το σχήμα των κωνικών φιαλών. Κάτω από τις βέλτιστες συνθήκες καλλιέργειας, η παραγωγή της ανασυνδυασμένης ξυλανάσης αυξήθηκε κατά 50%, φτάνοντας την τελική απόδοση των 170 U/mL, που υποδεικνύουν ότι ο αερισμός είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας για τη βελτίωση της παραγωγής ενζύμων.

Επίσης πραγματοποιήθηκαν μια σειρά πειραμάτων που αριστοποιούν την παραγωγή της εστεράσης του φερουλικού οξέος (FoFaeC-12213), η οποία κλωνοποιήθηκε και υπερεκφράστηκε από τους Moukouli et al, 2008. Εκτιμήθηκε η επίδραση της αρχικής τιμής pH, η συγκέντρωση μεθανόλης, ο ρυθμός της ανάδευσης και ο σχεδιασμός των φιαλών για τον αερισμό της καλλιέργειας ομοίως με την ξυλανάση. Παρατηρήθηκε ότι η παραγωγή της εστεράσης αυξήθηκε κατά 60% περίπου φτάνοντας στην τελική απόδοση των 1512 U/L. Και πάλι εδώ βγάζουμε το συμπέρασμα ότι ο αερισμός είναι σημαντικός για την βελτίωση της παραγωγής ενζύμων και συγκεκριμένα της εστεράσης.

Τέλος, τα εξαγόμενα αποτελέσματα των δύο βελτιστοποιημένων εκφράσεων συγκρίθηκαν μεταξύ τους και συζητήθηκαν.

## **Abstract**

In this thesis was performed cloning and heterologous expression in methylotrophic yeast *Pichia pastoris* X33 of a xylanase family 11, (FoXyn11-09638) by microorganism *Fusarium oxysporum*. The mature xylanase gene, which was generated after the excision of one intron was transferred in the expression plasmid vector, pPICZaC. The gene with the final structure was integrated into the genome of the methylotrophic yeast *P. pastoris* X33 and the ability to produce xylanase activity in small-scale cultures in flasks was evaluated. Recombinant *P. pastoris* efficiently secreted xylanase into the medium and produced high level of enzymatic activity (110 U/ml) after 216 hours of growth, under methanol induction. To achieve higher enzyme production, the influence of initial pH, methanol concentration, agitation and flask design was evaluated. Under optimum culture conditions, production of the recombinant xylanase increased by 50%, reaching a final yield of 170 U/ml, underpinning aeration as the most important factor in improving enzyme production.

Also, a series of experiments were performed that optimizes the production of ferulic acid esterase (FoFaeC-12213), which was cloned and expressed by Moukouli et al, 2008. The effect of initial pH value, the concentration of methanol, the rate of agitation and the design of the bottles to aerate the culture were examined as in with xylanase. It was observed that the production of esterase increased approximately 60% to the final performance of 1512 U / L. Again we make the conclusion that the aeration is important for improving the production of enzymes. Finally, the results obtained both optimized expressions were compared and discussed.

# **Κεφάλαιο 1<sup>ο</sup> : Εισαγωγή και Σκοπός**

## **1. Εισαγωγή**

### **1.1. Δομή της ημικυτταρίνης**

Ο όρος ημικυτταρίνη υιοθετήθηκε για να προσδιορίσει τους άμορφους πολυμερείς υδατάνθρακες που συνοδεύουν την κυτταρίνη στις φυτικές ίνες. Διακρίνονται σε β-κυτταρίνες (με βαθμό πολυμερισμού 15-90) και σε γ-κυτταρίνες (με βαθμό πολυμερισμού μικρότερο από 15). Οι ημικυτταρίνες είναι γραμμικές ή διακλαδισμένες πολυμερείς ενώσεις δύο ή περισσότερων απλών σακχάρων. Πρόκειται για τις εξόζες γλυκόζη, μαννόζη, γαλακτόζη, τα ουρονικά οξέα και τις πεντόζες ξυλόζη και αραβινόζη. Οι β-1,4-γλυκοζιτικοί δεσμοί με τους οποίους κυρίως είναι ενωμένες οι δομικές μονάδες στις μοριακές αλυσίδες δίνουν στα πολυμερή μόρια των ημικυτταρινών ευθυτενές σχήμα που τους επιτρέπει να διατάσσονται παράλληλα και να σχηματίζουν μεγαλύτερα αθροίσματα που συγκρατούνται με δεσμούς υδρογόνου. Οι μοριακές αλυσίδες τους έχουν μικρότερο μήκος και βαθμό πολυμερισμού (200 – 500 μονάδες) από την κυτταρίνη. Το σύνολο της κυτταρίνης και των ημικυτταρινών ονομάζεται ολοκυτταρίνη.

Η παρουσία των ημικυτταρινών στη φύση είναι στενά συνδεδεμένη με την παρουσία της κυτταρίνης και της λιγνίνης. Όλα τα ξυλώδη φυτά περιέχουν και τα τρία παραπάνω συστατικά. Οι φυτικές ίνες που δεν περιέχουν λιγνίνη (π.χ. το βαμβάκι) δεν περιέχουν ούτε ημικυτταρίνες. Οι ημικυτταρίνες αποτελούν το **15-40%** (ανάλογα με το είδος του φυτού) της φυτικής μάζας. Τα πλατύφυλλα δένδρα περιέχουν κατά μέσο όρο περίπου 30% περισσότερες ημικυτταρίνες από τα κωνοφόρα, ενώ οι περισσότερες μη ξυλώδεις ίνες περιέχουν περισσότερες ημικυτταρίνες από τις ξυλώδεις. Η κατανομή τους στα κυτταρικά τοιχώματα δεν είναι ομοιόμορφη. Περιέχονται σε μεγάλα ποσοστά στη μεσοκυττάρια στρώση και στο πρωτογενές τοίχωμα. Οι ημικυτταρίνες των σκληρών ξύλων περιέχουν μικρότερο ποσοστό μαννόζης και μεγαλύτερο ποσοστό ξυλόζης συγκριτικά με τα μαλακά ξύλα. Οι ημικυτταρίνες τοποθετούνται παράλληλα και κατά μήκος των

ινιδίων, τα οποία και περιβάλλουν. Καταλαμβάνουν χώρους μεταξύ των ινιδίων της κυτταρίνης και μαζί με τη λιγνίνη σχηματίζουν την άμορφη μάζα (σύμπλοκο ημικυτταρινών - λιγνίνης) που συνδέει και συγκρατεί τα ινίδια στα κυτταρικά τοιχώματα. Πιστεύεται ότι οι ημικυτταρίνες είναι χημικά ενωμένες με τη λιγνίνη. Οι μοριακές ιδιότητες δεν επιτρέπουν στις ημικυτταρίνες να σχηματίσουν μόνες τους μηχανικώς ισχυρά υλικά όπως συμβαίνει με την κυτταρίνη. Κύριος προσορισμός τους, όπως και της λιγνίνης, φαίνεται να είναι η ενίσχυση των μηχανικών ιδιοτήτων των μικροϊνιδίων της κυτταρίνης. Μαζί με την λιγνίνη δρουν ως συγκολλητικές ουσίες και συγκρατούν τα μικροϊνίδια και τα κύτταρα στη δόμηση του ξύλινου ιστού, ώστε να σχηματίζεται ένα ισχυρό μηχανικό υλικό.

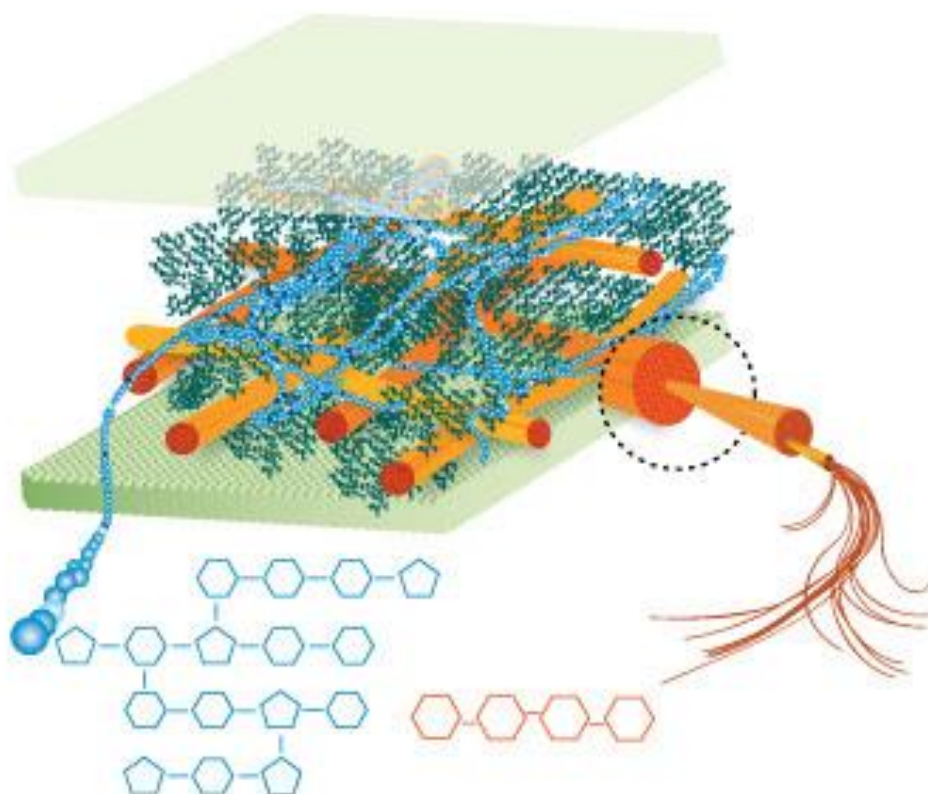
#### **1.1.1. Χημικές ιδιότητες**

Οι ημικυτταρίνες ως πολυσακχαρίτες μοιάζουν με την κυτταρίνη στη χημική δομή και τις ιδιότητες. Έτσι, τα υδροξύλια σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου, ενώσεις προσθήκης και αντικατάστασης και οξειδώνονται. Επίσης, αποικοδομούνται με επίδραση οξέων, αλκάλων, οξειδωτικών ουσιών, ενζύμων, φωτός και θερμότητας. Σε αντίθεση με την κυτταρίνη, οι ημικυτταρίνες είναι άμορφες και τοποθετημένες στα κυτταρικά τοιχώματα ανάμεσα στα ινίδια. Έτσι τα χημικά αντιδραστήρια έρχονται σε επαφή και αντιδρούν με τις ημικυτταρίνες ευκολότερα από ό, τι με την κυτταρίνη.

Το σχετικά μικρό μέγεθος των πολυμερών μορίων και η παρουσία πλευρικών διακλαδώσεων κατά μήκος των μοριακών αλυσίδων καθιστούν διαλυτές τις ημικυτταρίνες σε διάφορους διαλύτες. Η δέσμευση πολλών υδροξυλίων σε ακετυλομάδες και πλευρικές διακλαδώσεις διαφοροποιεί επίσης τη χημική δραστηριότητα των ημικυτταρινών. Οι ημικυτταρίνες, λόγω της ύπαρξης υδροξυλίων, ακετυλομάδων και καρβοξυλομάδων έχουν μεγάλη υγροσκοπικότητα, πολύ μεγαλύτερη από την κυτταρίνη και τη λιγνίνη. Είναι αδιάλυτες όμως στο νερό λόγω της πλοκής των μακρομορίων μεταξύ τους καθώς επίσης με τη λιγνίνη και, σε μικρότερο βαθμό, με την κυτταρίνη. Η διόγκωση των ημικυτταρινών μέσω της προσρόφησης νερού είναι μεγαλύτερη από της κυτταρίνης, λόγω της μεγαλύτερης υγροσκοπικότητας και της απουσίας κρυσταλλινών. Προσθήκη μικρών ποσοτήτων



αλκάλων στο νερό διογκώνει απεριόριστα τις ημικυτταρίνες και προκαλεί διάλυσή τους. Οι ημικυτταρίνες υδρολύονται με αραιά οξέα σε απλά σάκχαρα. Λόγω της έλλειψης κρυσταλλικότητας, οι ημικυτταρίνες υδρολύονται πολύ ευκολότερα από την κυτταρίνη. Αυτό κάνει δυνατή την εκλεκτική υδρόλυση των ημικυτταρινών και τη διατήρηση της κυτταρίνης. Επιπλέον, η υδρόλυση των ημικυτταρινών ευνοεί την ενζυματική υδρόλυση της απομένουσας κυτταρίνης. Η πλήρης όξινη υδρόλυση των ημικυτταρινών των σκληρών ξύλων παράγει κυρίως γλυκόζη και ξυλόζη, ενώ των μαλακών ξύλων γλυκόζη και μαννόζη. Σε υψηλές θερμοκρασίες τα παραγόμενα σάκχαρα διασπώνται σε φουρφουράλη και υδροξυ-μεθυλο-φουρφουράλη. Υδρόλυση των ημικυτταρινών με αλκαλικά διαλύματα πραγματοποιείται μόνο σε υψηλές θερμοκρασίες με μηχανισμό ανάλογο της υδρόλυσης της κυτταρίνης. Η ύπαρξη πλευρικών διακλαδώσεων από ουρονικά οξέα κατά μήκος των μοριακών αλυσίδων καθιστά τις ημικυτταρίνες ανθεκτικότερες από την κυτταρίνη στην υδρολυτική δράση των αλκάλων.



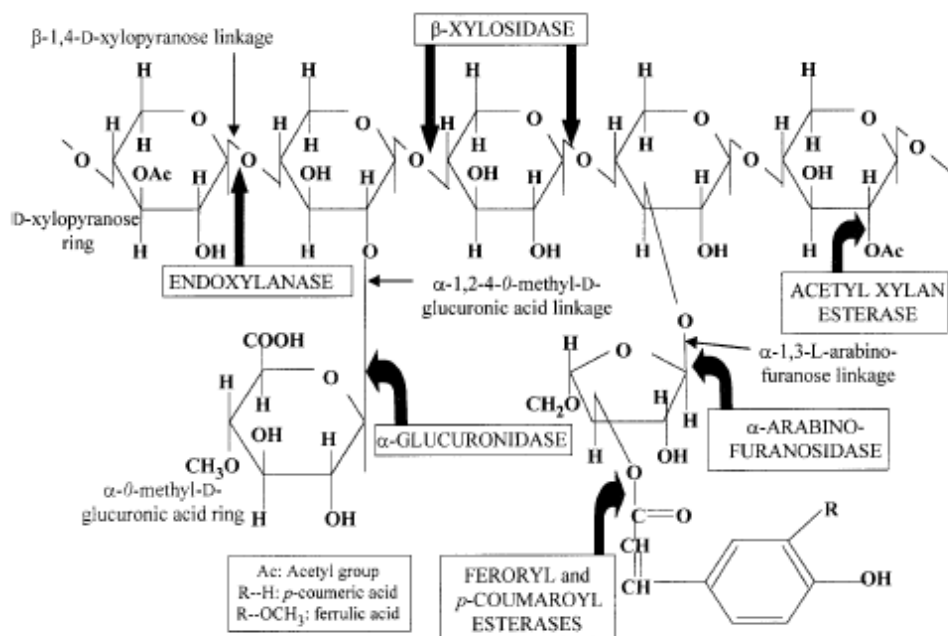
**Εικόνα 1: Απεικόνιση της κυτταρίνης, της ημικυτταρίνης και της λιγνίνης στο κυτταρικό τοίχωμα των φυτών**

### 1.1.2. Ξυλάνη

Η ξυλάνη, ο δεύτερος πιο άφθονος πολυσακχαρίτης και σημαντικό συστατικό των κυτταρικών τοιχωμάτων των φυτών (αντιπροσωπεύοντας ένα ποσοστό 30-35% του συνολικού ξηρού βάρους), αποτελείται από ενωμένα με δεσμό β-(1→4) κατάλοιπα ξυλοπυρανόζης. Τα κυτταρικά τοιχώματα των φυτών αποτελούν ένα σύνθετο υλικό στο οποίο η κυτταρίνη, η ημικυτταρίνη (κυρίως ξυλάνη) και η λιγνίνη συνδέονται στενά. Τρία σημαντικά συστατικά του ξύλου είναι η κυτταρίνη (35-50%), η ημικυτταρίνη (20-30%) - μια ομάδα υδατανθράκων στην οποία η ξυλάνη αποτελεί το μεγαλύτερο τμήμα - και η λιγνίνη (20-30%).

Η ξυλάνη είναι ένας ετεροπολυσακχαρίτης που περιέχει ακετυλομάδες, 4-O-μεθυλο-D-γλυκουρονικές ομάδες και ομάδες α-αραβινοφουρανόζης, συνδεδεμένες σε μία κύρια αλυσίδα η οποία αποτελείται από ενωμένα με δεσμό β-(1→4) μόρια ξυλοπυρανόζης. Εμφανίζει ιδιότητες δέσμησης μέσω ομοιοπολικών και μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων με τη λιγνίνη, την κυτταρίνη και άλλα πολυμερή. Η λιγνίνη συνδέεται στην ξυλάνη μέσω ενός εστερικού δεσμού στα μόρια του 4-O-μεθυλο-D-γλυκουρονικού οξέος (Εικόνα 2). [S. Subramaniyan et al,2002]

Οι περισσότερες ξυλάνες εμφανίζονται ως ετεροπολυσακχαρίτες, που περιέχουν διαφορετικές ομάδες υποκαταστατών στην κύρια αλυσίδα και στις πλευρικές αλυσίδες. Οι κοινοί υποκαταστάτες που υπάρχουν στην κύρια αλυσίδα της ξυλάνης είναι ακετυλομάδες, ομάδες αραβινόζης και γλυκουρονικές ομάδες. Οι ομοξυλάνες, από την άλλη πλευρά, αποτελούνται αποκλειστικά από ομάδες ξυλόζης. Αυτό το είδος ξυλάνης δεν είναι ευρέως διαδεδομένο στη φύση και έχει απομονωθεί από ένα σκληρό, νευρώδες χόρτο (*Stipa tenacissima*) το οποίο συναντάται στη Βόρεια Αφρική και τη Νότια Ευρώπη, το οποίο παράγει φυτικές ίνες που χρησιμοποιούνται στην κατασκευή χαρτιού και ως σχοινιά. Επιπλέον, έχει απομονωθεί από στελέχη καπνού και από τον φλοιό σπόρων γκουάρ. Οι ξυλάνες με σύνδεση κύριας αλυσίδας με δεσμούς β-1,3 έχουν αναφερθεί στα θαλάσσια φύκια. Η μικτή σύνδεση των β-1,3-ξυλανών και β-1,4-ξυλανών συναντάται σε φύκια όπως το *Palmeria palmata*. [Q.K.Beg et al,2001].



**Εικόνα 2:** Ξυλανολυτικό σύστημα ενζύμων

Όπως είναι γνωστό, διάφοροι μικροοργανισμοί παράγουν ένα πλήθος ενζύμων με στόχο την αποικοδόμηση των συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος. Λόγω της πολυπλοκότητας της δομής της ξυλάνης με τα διάφορα είδη δεσμών και υποκαταστατών απαιτείται η χρήση ενός σύνθετου συστήματος ενζύμων έτσι ώστε να επιτευχθεί η αποικοδόμηση της το οποίο καλείται ξυλανολυτικό σύστημα ενζύμων (Εικόνα 2) [Uffen, 1997]. Τα ξυλανολυτικά ένζυμα παράγονται από μια ποικιλία μικροοργανισμών που περιλαμβάνουν αερόβια και αναερόβια, μεσόφιλα και θερμόφιλα είδη [Lee et al, 1992].

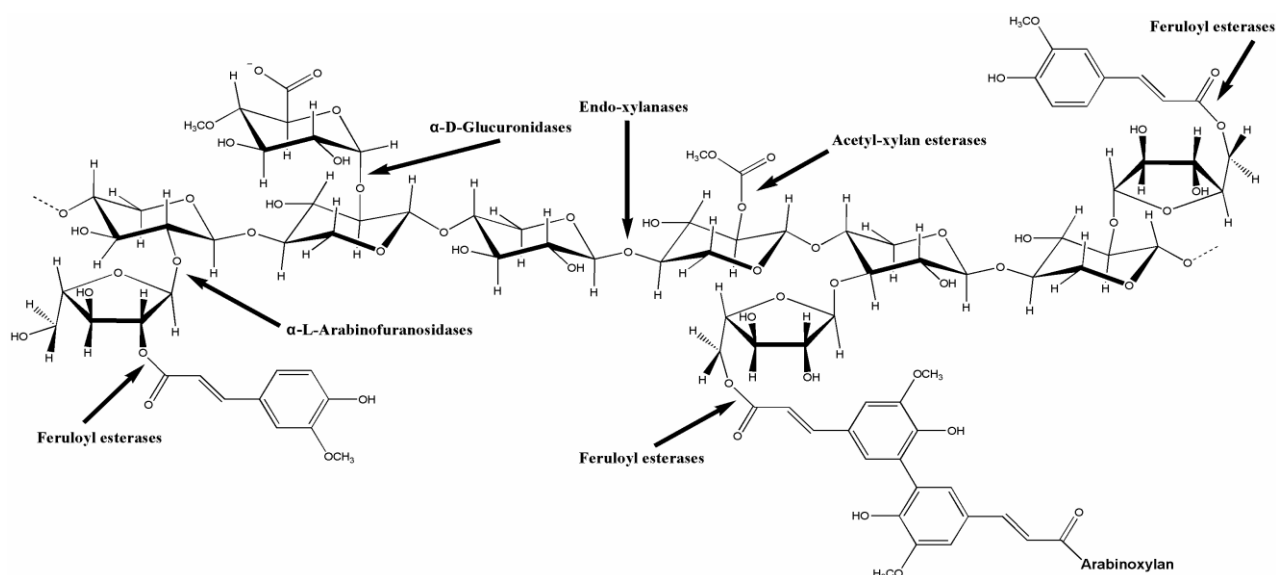
Τα ένζυμα τα οποία διασπούν την δομή της ξυλάνης διακρίνονται σε κύρια και δευτερεύοντα ανάλογα σε ποιο σημείο του μορίου της ξυλάνης επικεντρώνεται η δράση τους.

Τα κύρια ξυλανολυτικά ένζυμα επιδρούν στην κεντρική αλυσίδα του μορίου της ξυλάνης διασπώντας τους β-1,4- γλυκοζιτικούς δεσμούς που βρίσκονται ανάμεσα στα μόρια της D-ξυλόζης. Υπάρχουν δύο ομάδες κύριων ενζύμων, οι ενδοξυλανάσες (E.C. 3.2.1.8- κωδικός που αντιστοιχεί παγκόσμια στην κατηγορία αυτή των ενζύμων) και οι β-ξυλοζιδάσες (E.C. 3.2.1.37). Οι ενδοξυλανάσες διασπούν την

αλυσίδα της ξυλάνης σε τυχαίες θέσεις παράγοντας ξυλο-ολιγοσακχαρίτες μικρότερου βαθμού πολυμερισμού, ενώ οι β-ξυλοζιδάσες αποικοδομούν περαιτέρω τους ολιγοσακχαρίτες αποσπώντας μόρια ξυλόξης από τα μη αναγωγικά άκρα των ολιγοσακχαριτών.

Τα δευτερεύοντα ξυλανολυτικά ένζυμα διασπούν τους εστερικούς δεσμούς που συνδέουν τις πλευρικές ομάδες με την κεντρική πολυμερική αλυσίδα, όπως επίσης και τους δεσμούς μεταξύ των κινναμικών οξέων και των μορίων της L-αραβινόξης. Διακρίνονται σε αραβινοφουρανοζιδάσες (E.C. 3.2.1.55), σε α-γλυκουρονιδάσες (E.C. 3.2.1.1), σε εστεράσες του οξικού οξέος (E.C. 3.2.1.72) και σε εστεράσες του φερουλικού οξέος (E.C. 3.2.1.73) ανάλογα με την αντίστοιχη πλευρική ομάδα που απελευθερώνουν [Collins et al, 2005].

Για την πλήρη αποικοδόμηση της ξυλάνης απαιτείται συνεργιστική δράση μεταξύ των κύριων και δευτερευόντων ξυλανολυτικών ενζύμων. Η δράση μόνο των κυρίων ενζύμων, ιδίως κοντά στα σημεία διακλάδωσης, θα οδηγούσε σε χαμηλούς ρυθμούς υδρόλυσης των γλυκοζιτικών δεσμών, ενώ η αποικοδόμηση θα ήταν ατελής. Αυτό οφείλεται στην στερεοχημική παρεμπόδιση των πλευρικών ομάδων που δεν επιτρέπουν στα κύρια ένζυμα να προσεγγίσουν την πολυμερική αλυσίδα της ξυλόξης. Έτσι με την χρήση των δευτερευόντων ενζύμων επιτυγχάνεται η απομάκρυνση των υποκαταστατών και εξασφαλίζεται η αποτελεσματική δράση των ενδοξυλανασών και των β-ξυλοζιδασών [Zeng et al, 2007].



**Εικόνα 3:** Ένζυμα που αποικοδομούν την ημικυτταρίνη

### 1.1.3. Ξυλανάσες

Η σύνθετη δομή της ξυλάνης, όπως ήδη αναφέρθηκε, απαιτεί διαφορετικά ένζυμα για την πλήρη υδρόλυσή της. Οι ενδο-β-1,4-ξυλανάσες αποπολυμερίζουν την ξυλάνη μέσω τυχαίας υδρόλυσης της κύριας αλυσίδας της ξυλάνης και οι 1,4-β-D-ξυλοζιδάσες διαχωρίζουν τους μικρούς ολιγοσακχαρίτες. Οι πλευρικές ομάδες που υπάρχουν στην ξυλάνη απελευθερώνονται από τις α-L-αραβινοφουρανοζιδάσες, τις α-D-γλυκουρονιδάσες, τις γαλακτοζιδάσες και τις ακετυλοεστεράσες. Τα ένζυμα αυτά ενεργούν σε συνεργασία προκειμένου να μετατρέψουν την ξυλάνη στα συστατικά της σάκχαρα [S. Subramaniam et al, 2002].

Οι ενδο-ξυλανάσες, παράγονται κυρίως από μικροοργανισμούς. Πολλά από τα βακτήρια και τους μύκητες έχουν την ικανότητα να παράγουν ξυλανάσες. Ωστόσο, υπάρχουν αναφορές σχετικά με την καταγωγή της ξυλάνης από τα φυτά, που είναι η παραγωγή ενδο-ξυλανάσης σε Ιαπωνικά αχλάδια κατά την περίοδο της ωρίμανσης και αργότερα απομονώθηκε μία ενδο-ξυλανάση με μοριακό βάρος 55 kDa από το αλεύρι του Ευρωπαϊκού σίτου (*Triticum aestivum*). Ορισμένα μέλη των ανώτερων ζώων, συμπεριλαμβανομένων των μαλακίων του γλυκού νερού, είναι σε θέση να παράγουν ξυλανάσες.

Υπάρχουν πολλές αναφορές στις μικροβιακές ξυλάνες, αρχής γενομένης το 1960, δίνοντας πρωταρχική σημασία στην παθολογία των φυτών που σχετίζονταν με τις μελέτες. Μόνο κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1980 εξετάστηκε η μεγάλη επίδραση της ξυλανάσης στον τομέα του βιοαποχρωματισμού.

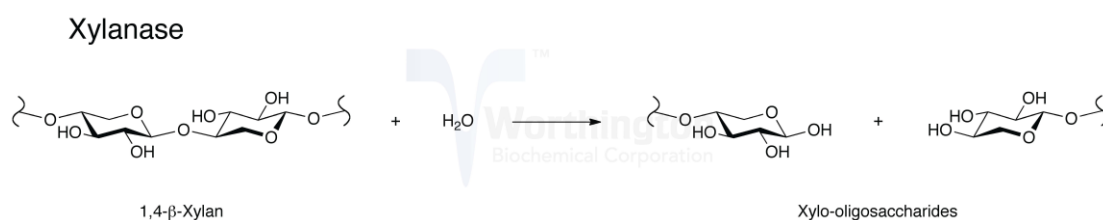
Οι εξω-1,4-β-D-ξυλοζιδάσες καταλύουν την υδρόλυση των (1,4)-β-D-ξύλο-ολιγοσακχαριτών με την απομάκρυνση διαδοχικών τμημάτων D-ξυλόζης από το μη αναγωγικό άκρο. Οι ενδο-ξυλανάσες που απελευθερώνουν ξυλόζη κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης της ξυλάνης έχουν αναφερθεί ότι δεν έχουν καμία δραστικότητα στην ξυλοβιόζη, η οποία θα μπορούσε εύκολα να υδρολυθεί από β-ξυλοζιδάσες. Υπάρχουν αναφορές σχετικά με το βακτήριο *Bacillus* sp. και με διάφορους μύκητες για την παραγωγή ενδοκυτταρικής β-ξυλοζιδάσης.

Οι α-Αραβινοφουρανοζιδάσες καταλύουν την τερματική, μη αναγωγική α-αραβινοφουρανοσυλομάδα της αραβινάνης, της αραβινοξυλάνης και της αραβινογαλακτάνης. Ένας αριθμός μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων των

μυκήτων, ακτινομυκήτων και άλλων βακτηριδίων, έχουν αναφερθεί ως ικανά για την παραγωγή α-αραβινοζιδάσης. Το εξαιρετικά θερμοφίλο βακτήριο *Rhodothermus marinus* έχει την ικανότητα να παράγει α-L-αραβινοφουρανοζιδάσες. Δύο διαφορετικά πολυπεπίδια στο βακτήριο *Bacillus polymyxa* χαρακτηρίστηκαν σε γονιδιακό επίπεδο ικανά για την παραγωγή α-αραβινοζιδάσης.

Οι α-D-γλυκουρονιδάσες είναι απαραίτητες για την υδρόλυση α-1,2-γλυκοζιτικών δεσμών ανάμεσα στην ξυλόζη και στο D-γλυκουρονικό οξύ. Η υδρόλυση του πολύ σταθερού αυτού δεσμού αποτελεί εμπόδιο στην ενζυματική υδρόλυση της ξυλάνης και οι αναφερθέντες α-γλυκουρονιδάσες έχουν διαφορετικές απαιτήσεις όσον αφορά στο υπόστρωμα.

Η πλήρης υδρόλυση των φυσικών γλυκουρονοξυλανών απαιτεί εστεράσες για να απομακρύνουν τα δεσμευμένα οξικά και φαινολικά οξέα. Οι εστεράσες σπάνε τους δεσμούς της ξυλόζης με το οξικό οξύ (ακετυλοεστεράσες), τους δεσμούς των πλευρικών αλυσίδων αραβινόζης με το φερουλικό οξύ (εστεράσες του φερουλικού οξέος) και τους δεσμούς των πλευρικών αλυσίδων αραβινόζης με το κουμαρικό οξύ. Η διάσπαση των δεσμών αυτών και η απομάκρυνση των ομάδων των οξέων από την ξυλάνη είναι χρήσιμη για την απομάκρυνση της λιγνίνης. Μπορεί να συμβάλει στη διαλυτοποίηση της λιγνίνης με τη διάσπαση των εστερικών δεσμών ανάμεσα στη λιγνίνη και της ημικυτταρίνες. Αν χρησιμοποιούνται μαζί με της ξυλανάσες και άλλα ξυλανολυτικά ένζυμα στον βιοαποχρωματισμό (biobleaching) των πολτών, οι εστεράσες θα μπορούσαν εν μέρει να διαταράξουν και να χαλαρώσουν την δομή του κυτταρικού τοιχώματος. [S. Subramaniyan et al,2002]



**Εικόνα 4: Μοριακή απεικόνιση της ξυλάνωσης**

### 1.1.3.1 Κατηγοριοποίηση των ξυλανασών

Η ανομοιογένεια και η πολυπλοκότητα της ξυλάνης οδήγησε σε μία πληθώρα διαφορετικών ξυλανασών με ποικίλες ιδιαιτερότητες, πρωτογενείς ακολουθίες και πτυχώσεις, και συνεπώς οδήγησε σε περιορισμούς στην κατάταξη των ενζύμων αυτών από την ιδιαιτερότητα του υποστρώματος και μόνο.

Ο Wong το 1988 <sup>[10]</sup> κατέταξε τις μικροβιακές ξυλανάσες σε δύο ομάδες βάσει των φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους, όπως η μοριακή μάζα και το ισοηλεκτρικό σημείο, αντί των διαφορετικών καταλυτικών τους ιδιοτήτων. Η μία ομάδα αποτελείται από ένζυμα υψηλού μοριακού βάρους (>30kDa) και χαμηλών τιμών ισοηλεκτρικού σημείου (όξινο pI). Η άλλη ομάδα αποτελείται από ένζυμα χαμηλού μοριακού βάρους (<30kDa) και υψηλών τιμών ισοηλεκτρικού σημείου (βασικό pI). Ωστόσο, έχουν βρεθεί πολλές εξαιρέσεις σε αυτό το μοτίβο και περίπου το 30% των πρόσφατα εντοπιζόμενων ξυλανασών, ιδίως οι μυκητικές ξυλανάσες, δεν μπορούν να ταξινομηθούν από αυτό το σύστημα. [Collins et al, 2005]

Οι ενδοξυλανάσες υψηλού μοριακού βάρους και χαμηλών τιμών pI ανήκουν στην **οικογένεια 10**, παλαιότερα γνωστή και ως οικογένεια « F », ενώ οι ενδοξυλανάσες χαμηλού μοριακού βάρους και υψηλών τιμών pI ανήκουν στην **οικογένεια 11**, παλαιότερα γνωστή ως οικογένεια « G ».

Ο Biely το 1985 <sup>[11]</sup>, ύστερα από εκτενή μελέτη στις διαφορές των καταλυτικών ιδιοτήτων μεταξύ των οικογενειών των ξυλανασών, κατέληξε στο συμπέρασμα ότι οι ενδοξυλανάσες της οικογένειας 10, σε αντίθεση με τα μέλη της οικογένειας 11, μπορούν να επιτεθούν στους γλυκοζιτικούς δεσμούς δίπλα στα σημεία διακλάδωσης και προς το μη αναγωγικό άκρο. Ενώ οι ενδοξυλανάσες που ανήκουν στην οικογένεια 10 απαιτούν δύο μη υποκατεστημένα τμήματα ξυλοπυρανόξης ανάμεσα στις διακλαδώσεις, οι ενδοξυλανάσες της οικογένειας 11 απαιτούν τρία συνεχόμενα μη υποκατεστημένα τμήματα ξυλοπυρανόξης. Οι ενδοξυλανάσες της οικογένειας 10 κατέχουν πολλές καταλυτικές δραστηριότητες συμβατές με τις β-ξυλοζιδάσες [S. Subramaniam et al, 2002].

Ύστερα από εκτενή ανάλυση, ο Sarag και οι συνεργάτες του το 2002 <sup>[12]</sup> εφάρμοσαν μία νέα μέθοδο για την κατάταξη των ξυλανασών της οικογένειας 11. Η οποία θα μπορούσε να υποδιαιρεθεί σε έξι κύριες ομάδες. Οι I, II και III περιέχουν

κυρίως ένζυμα που προέρχονται από μύκητες. Τα ένζυμα στις ομάδες I και II είναι γενικά ένζυμα των 20kDa από τους μύκητες *Ascomyceta* και *Basidiomyceta*. Τα ένζυμα της ομάδας I έχουν βασικές τιμές pI, ενώ εκείνα της ομάδας II εμφανίζουν όξινο pI. Τα ένζυμα της ομάδας III παράγονται κυρίως από αναερόβιους μύκητες.

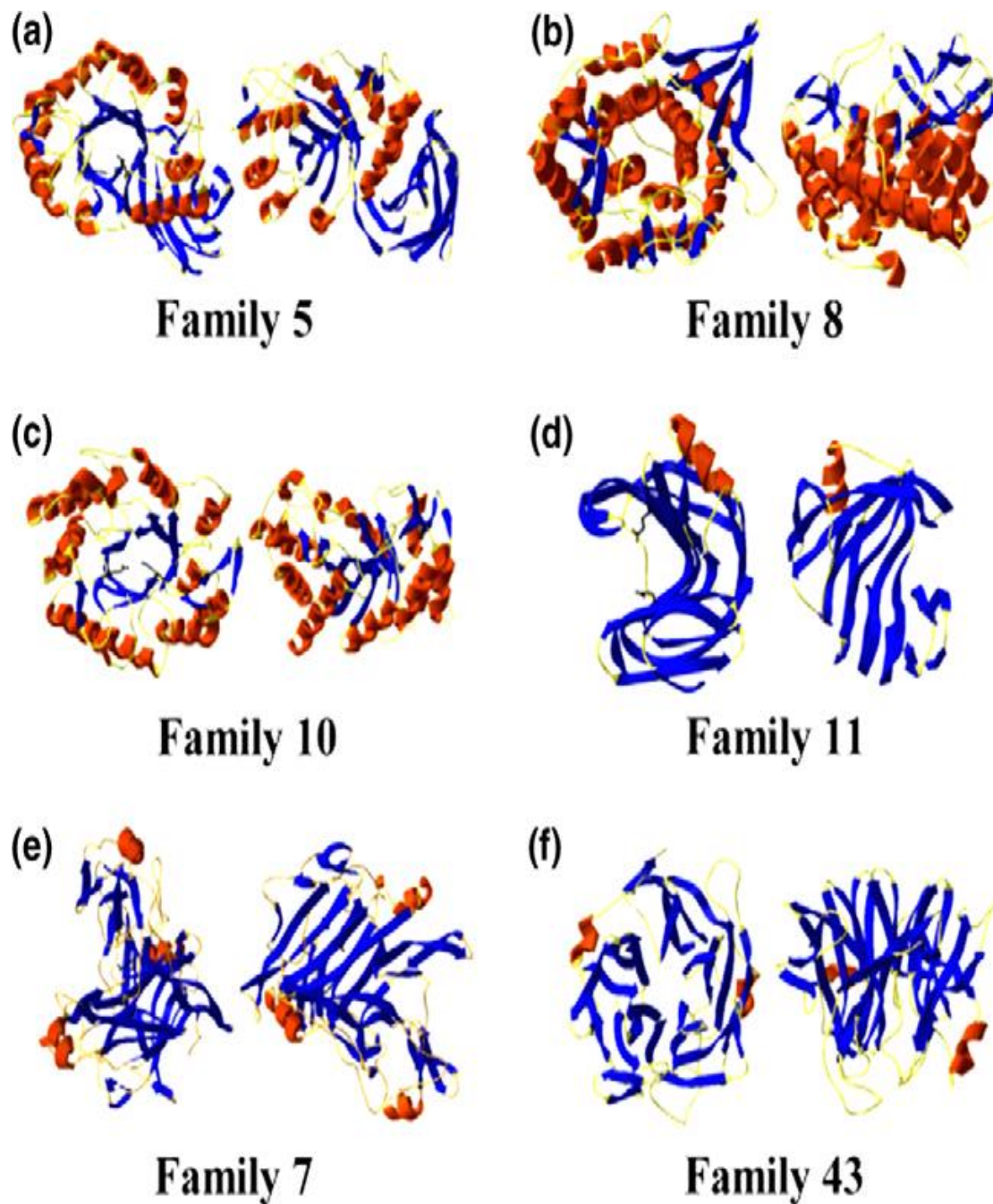
Οι βακτηριακές ξυλανάσες έχουν χωριστεί σε τρεις ομάδες A, B και C. Η ομάδα A περιλαμβάνει κυρίως ένζυμα που παράγονται από μέλη των οικογενειών βακτηρίων *Actinomycetaceae* και *Bacillaceae*, αυστηρά αερόβια και θετικά κατά Gram βακτήρια. Οι ομάδες B και C συνδέονται στενότερα και περιέχουν κυρίως ένζυμα από αναερόβια, θετικά κατά Gram βακτήρια, που συνήθως βρίσκονται στο πρώτο τμήμα του στομάχου των μηρυκαστικών ζώων. Ξυλανάσες από αερόβια και αρνητικά κατά Gram βακτήρια βρίσκονται στην υποομάδα I<sub>c</sub>, επειδή μοιάζουν πολύ στα ένζυμα από τους μύκητες της ομάδας I. Σε αντίθεση με προηγούμενες ταξινομήσεις, εισήγαγαν επιπλέον μία τετάρτη ομάδα μυκητικών ξυλανασών που αποτελείται από δύο μόνο ένζυμα. [S. Subramaniam et al, 2002]

Όσον αφορά την κατάταξη των μικροβιακών ξυλανασών σε δύο οικογένειες, 10 και 11, λίγο αργότερα (1989) εισήχθη ένα πιο ολοκληρωμένο σύστημα ταξινόμησης, το οποίο επέτρεπε την κατάταξη όχι μόνο των ξυλανασών, αλλά των γλυκοζιδασών γενικά και το οποίο έχει πλέον γίνει πρότυπο μέσο για την κατάταξη των ενζύμων αυτών. Το σύστημα αυτό βασίζεται σε συγκρίσεις πρωτοταγούς δομής των καταλυτικών τομέων μόνο και ομάδων ενζύμων σε οικογένειες με συγγενικές αλληλουχίες. Σήμερα, αριθμούνται 115 οικογένειες γλυκοζιδασών [[http://www.cazy.org/fam/acc\\_GH.html](http://www.cazy.org/fam/acc_GH.html)]. Δεδομένου ότι η δομή και ο μοριακός μηχανισμός ενός ενζύμου σχετίζονται με την πρωτοταγή δομή του, αυτό το σύστημα ταξινόμησης αντικατοπτρίζει τόσο τα δομικά χαρακτηριστικά όσο και αυτά που αφορούν το μηχανισμό. Τα ένζυμα εντός μιας συγκεκριμένης οικογένειας έχουν παρόμοια τρισδιάστατη δομή και παρόμοιο μοριακό μηχανισμό και, επίσης, είναι πιθανό να έχουν παρόμοια εκλεκτικότητα στη δράση τους σε μικρά, διαλυτά, συνθετικά υποστρώματα. Επιπλέον, ορισμένες από τις οικογένειες έχουν συγγενικές τρισδιάστατες δομές, με αποτέλεσμα αυτές οι οικογένειες να ομαδοποιούνται σε υψηλότερα επίπεδα ιεραρχίας, ονομαζόμενα φυλές (clans).

Σύμφωνα με το προηγούμενο σύστημα ταξινόμησης, οι ξυλανάσες περιορίζονται στις οικογένειες 10 και 11. Ενδιαφέρον παρουσιάζει, όμως, το



γεγονός ότι η έρευνα σε κατάλληλες βάσεις δεδομένων χρησιμοποιώντας τον αριθμό ταξινόμησης του ενζύμου δείχνει ότι ένζυμα που εμφανίζουν δραστικότητα στην ξυλάνη συναντώνται και στις οικογένειες 5, 7, 8, 16, 26, 43, 52 και 62. [Collins et al,2005]



Εικόνα 5: Οικογένειες των ξυλανασών

#### 1.1.4. Εστεράσες του φερουλικού οξέος

Οι εστεράσες του φερουλικού οξέος [FAEs, E.C.3.1.1.73] αποτελούν υποομάδα των καρβοξυλ-εστερασών και η δράση τους στη φύση έγκειται στην απελευθέρωση φαινολικών οξέων (φερουλικό και π-κουμαρικό οξύ), καθώς και των διμερών μορφών τους από τις ημικυτταρίνες φυσικής προέλευσης, όπου, κυρίως, απαντώνται με τη μορφή εστέρων με πολυσακχαρίτες που περιέχουν μονάδες L-αραβινοφουρανόζης, όπως π.χ. L-αραβινο-D-ξυλάνες και L-αραβινάνες [Borneman et al., 1991; Williamson et al., 1998a; Faulds & Williamson, 2003].

Οι εστεράσες του φερουλικού οξέος (FAEs) αποτελούν μία ομάδα ενζύμων με αρκετές διαφοροποιήσεις, με λίγες ενοποιημένες αλληλουχίες αμινοξέων και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά που τις συνδέουν. Πρόσφατα, η χρήση πολλαπλών συσχετίσεων αλληλουχιών (alignments) ή τομέων χαρακτηριστικών της ενεργότητας των εστερασών του φερουλικού οξέος, καθώς και σχετικών αλληλουχιών, βοήθησε στην κατασκευή ενός φυλογενετικού δέντρου [Crepin et al., 2004a]. Το πόρισμα της γενετικής αυτής συσχέτισης ήταν σύμφωνο με την υδρολυτική εξειδίκευση των εστερασών έναντι προτύπων υποστρωμάτων και οδήγησε στην κατάταξη των εστερασών του φερουλικού οξέος σε τέσσερις τύπους: A, B, C και D. Από την κατάταξη αυτή φαίνεται πως υπάρχει μία εξελικτική σχέση μεταξύ των εστερασών του φερουλικού οξέος, των εστερασών του οξικού οξέος και των λιπασών. Η υδρολυτική τους εξειδίκευση βασίστηκε στην εξειδίκευσή τους έναντι μονο- και διφερουλικών εστέρων, στην διαφορετική υποκατάσταση του φαινολικού δακτυλίου των υποστρωμάτων και στην ομοιότητα της αλληλουχίας των αμινοξέων τους. Η ονοματολογία των εστερασών του φερουλικού οξέος αφορά τόσο στην προέλευση του ενζύμου όσο και στον τύπο της εστεράσης του φερουλικού οξέος (π.χ. η εστεράση του φερουλικού οξέος τύπου C από το μύκητα *F. oxysporum* ονομάζεται FoFaeC).

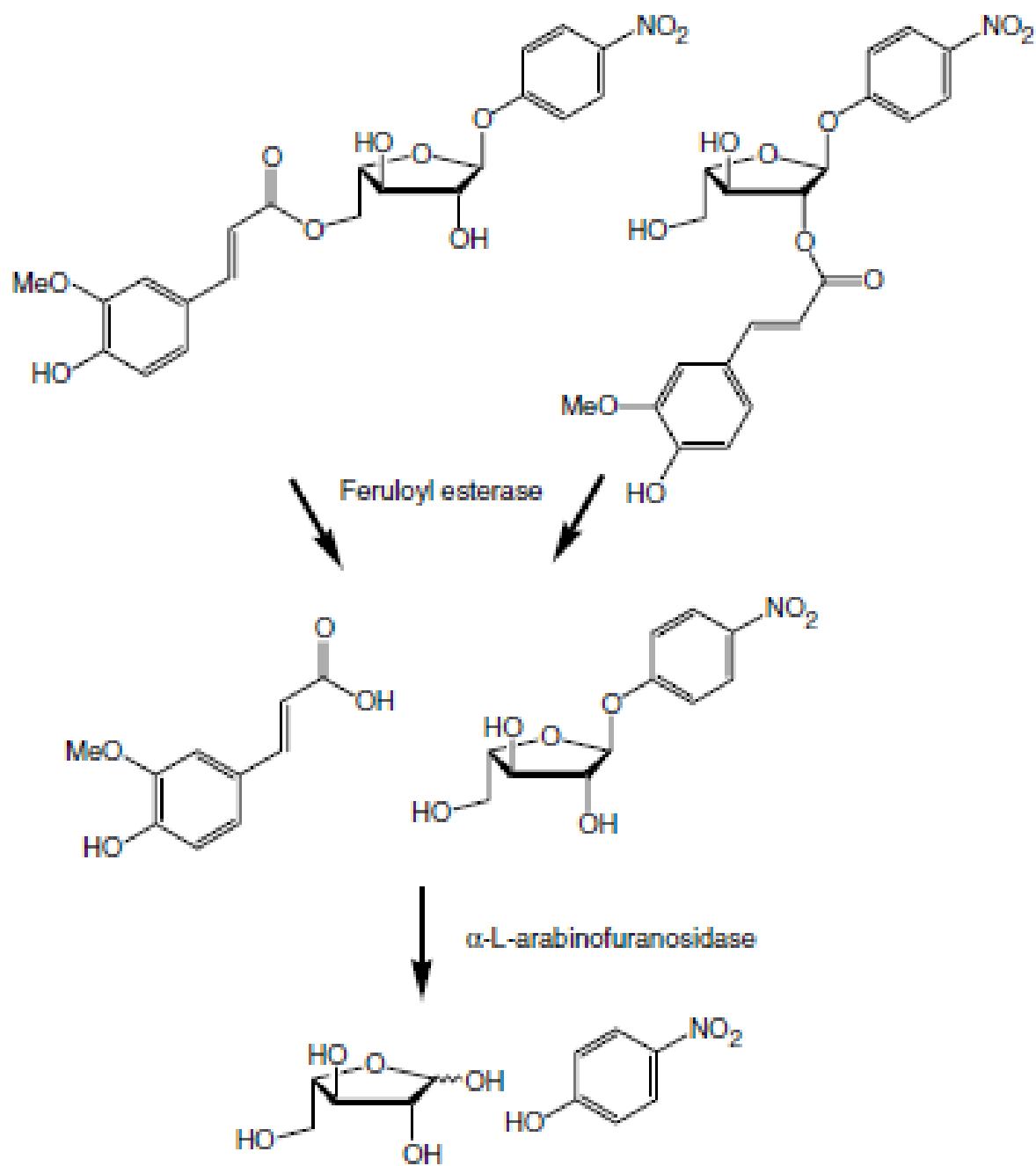
Ένα σύνηθες χαρακτηριστικό των εστερασών του φερουλικού οξέος είναι το γεγονός ότι δρουν σε ένα μεγάλο εύρος υποστρωμάτων. Ως πρότυπα υποστρώματα για την κατάταξη των εστερασών του φερουλικού οξέος χρησιμοποιήθηκαν οι μεθυλεστέρες των υδροξυ-κινναμικών οξέων.

Οι εστεράσες του φερουλικού οξέος τύπου Α δείχνουν προτίμηση στο φαινολικό τμήμα του υποστρώματος που περιέχει μεθοξυ υποκαταστάτες, ιδίως όταν αυτοί βρίσκονται σε μετα θέσεις του δακτυλίου, όπως για παράδειγμα στο φερουλικό και το σιναπικό οξύ. Αντίθετα, οι εστεράσες του φερουλικού οξέος τύπου Β συμπεριφέρονται κατά συμπληρωματικό τρόπο σε σχέση με τις τύπου Α, δείχνοντας προτίμηση σε υποστρώματα που περιέχουν ένα ή δύο υδροξυ- υποκαταστάτες, όπως το π-κουμαρικό και το καφεϊκό οξύ. Οι εστεράσες τύπου Α, σε αντίθεση με τις τύπου Β, φαίνεται να προτιμούν υδρόφοβα υποστρώματα με ογκώδεις υποκαταστάτες του βενζολικού δακτυλίου [Kroon et al., 1997; Torakas et al., 2003a]. Επιπλέον, οι εστεράσες τύπου Α και D είναι ικανές να απελευθερώσουν μικρές ποσότητες διϋδροδιμερούς φερουλικού οξέος. Οι εστεράσες του φερουλικού οξέος τύπου C και D παρουσιάζουν ευρεία εξειδίκευση έναντι των υδροξυ-κιναμικών οξέων (φερουλικό, π-κουμαρικό, καφεϊκό και σιναπικό οξύ), ενώ η μόνη τους διαφορά έγκειται στην ικανότητα των τύπου D να απελευθερώνουν 5-5' διϋδροφερουλικό οξύ [Crepin et al., 2004a; Crepin et al., 2004b]. Στη φύση εξελίχθηκαν διάφοροι τύποι εστερασών του φερουλικού οξέος, που διαφέρουν μεταξύ τους ως προς την εξειδίκευσή τους στην υδρόλυση 5-Ο- και 2-Ο-φερουλοποιημένων α-L-αραβινοφουρανοζιτών. Εστεράσες τύπου Α είναι ενεργές μόνο σε υποστρώματα που περιέχουν μονάδες φερουλικού οξέος ενωμένες με εστερικό δεσμό στον άνθρακα 5 (C-5) του δακτυλίου της αραβινοφουρανόζης και όχι σε υποστρώματα, όπου το φερουλικό οξύ είναι ενωμένο στη θέση 2 (C-2). Αντίθετα, εστεράσες τύπου Β είναι ενεργές σε υποστρώματα που περιέχουν μονάδες φερουλικού οξέος ενωμένες με εστερικό δεσμό τόσο στη θέση 5 (C-5), όσο και στη θέση 2 (C-2) του δακτυλίου της αραβινοφουρανόζης με διαφορετικές προτιμήσεις από εστεράση σε εστεράση. Η ανικανότητα των εστερασών του φερουλικού οξέος τύπου Α να υδρολύουν τον C-2 δεσμό μεταξύ του φερουλικού οξέος και της L-αραβινοφουρανόζης μπορεί να αποτελέσει ένα νέο κριτήριο για την κατάταξη εστερασών του φερουλικού οξέος σε αυτόν τον τύπο. Οι εστεράσες του φερουλικού οξέος τύπου C και D μπορούν να υδρολύσουν και τους δύο δεσμούς.

#### 1.1.4.1 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των εστερασών του φερουλικού οξέος

Η πρώτη απομονωθείσα εστεράση του φερουλικού οξέος αναφέρθηκε στη βιβλιογραφία το 1991 [Faulds & Williamson, 1991]. Από τότε, περισσότερες από 30 εστεράσες του φερουλικού οξέος έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί από διάφορους μικροοργανισμούς, όπως ο *Aspergillus awamori*, ο *A. niger*, ο *Aspergillus oryzae*, ο *Aspergillus tubingensis*, ο *Aspergillus pullulans*, ο *Butyrivibrio fibrisolvent*, ο *C. japonicus*, το *Clostridium stercorearium*, το *Clostridium thermocellum*, ο *F. oxysporum*, ο *Fusarium proliferatum*, ο *Lactobacillus acidophilus*, ο *Penicillium expansum*, ο *Penicillium funiculosum*, ο *Penicillium pinophilum*, ο *Piromyces equi*, ο *Neocallimastix MC-2*, ο *Neurospora crassa*, ο *Sporotrichum thermophile*, ο *Sporotrichum olivochromogenes* και ο *Talaromyces stipitatus*. Οι απομονωθείσες εστεράσες του φερουλικού οξέος παρουσιάζουν διαφοροποιήσεις στα φυσικά τους χαρακτηριστικά, όπως στο μοριακό βάρος, στο ισοηλεκτρικό σημείο και στις βέλτιστες συνθήκες υδρολυτικής δράσης τους. Τα μοριακά τους βάρη κυμαίνονται μεταξύ 11 και 210 kDa και τα ισοηλεκτρικά τους σημεία μεταξύ 3 και 9,9. Δεν έχει βρεθεί μέχρι σήμερα καμία συσχέτιση μεταξύ των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών τους και των βέλτιστων συνθηκών δράσης τους. Οι μικροβιακές εστεράσες του φερουλικού οξέος παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα εξάρτησης από το pH και τη θερμοκρασία, με τις βέλτιστες ενεργότητές τους να εμφανίζονται μεταξύ pH 4,0–8,0 και 30–65 °C.

Μέχρι σήμερα, λόγω της έλλειψης διατηρημένων αλληλουχιών αμινοξέων μεταξύ των εστερασών του φερουλικού οξέος, δεν είναι δυνατή η περαιτέρω κατάταξή τους, πέρα από αυτή που αναφέρεται στην πρωτοταγή αλληλουχία των αμινοξέων τους, η οποία κατατάσσει την πλειοψηφία των ενζύμων αυτών στην οικογένεια 1 των καρβοξυλ-εστερασών της βάσης δεδομένων CAZy [Coutinho & Henrissat, 1999].



Εικόνα 6: Μοριακή απεικόνιση της εστεράσης του φερουλικού οξέος

#### **1.1.5. Συνεργισμός ενζύμων**

Η συνεργιστική δράση δύο ή περισσότερων ενζύμων κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης της ξυλάνης είναι προφανής όταν το ποσοστό της υδρόλυσης των πολυσακχαριτών με δύο ή περισσότερα ένζυμα είναι ταχύτερο από το άθροισμα των ποσοστών της υδρόλυσης με μεμονωμένα ένζυμα. Πολλά είδη συνεργισμού έχουν αναγνωριστεί μεταξύ των ξυλανολυτικών ενζύμων. Το σημαντικότερο είδος αφορά την συνεργασία μεταξύ των ενζύμων που δρουν στην κύρια αλυσίδα των ενδοξυλανασών (EXS) και τα ένζυμα που ελευθερώνουν υποκαταστάτες της πλευρικής αλυσίδας, όπως μονάδες του ακετυλίου και του αραβινοφουρανοσυλίου (arabinofuranosyl). Η δράση της ενδοξυλανάσης (EX) ελευθερώνει υποκατάστατα ξυλο-ολιγοσακχαριτών, τα οποία είναι πιο εύκολα διάχυτα και πιο ευνοϊκά υποστρώματα για τα βοηθητικά ένζυμα. Αντίθετα, η απομάκρυνση των υποκαταστατών της πλευρικής αλυσίδας από τα βοηθητικά ένζυμα δημιουργεί νέες τοποθεσίες για την κύρια αλυσίδα για παραγωγικό δέσιμο με την ενδοξυλανάση (EX). Για ορισμένα από τα βοηθητικά ένζυμα η διάσπαση της κύριας αλυσίδας είναι απαραίτητη. [Bielly et al, 2003]

#### **1.1.6. Εφαρμογές ξυλανασών – εστερασών**

##### **1.1.6.1 Ξυλανάσες**

Τα τελευταία χρόνια, η βιοτεχνολογική χρήση της ξυλάνης και των ξυλανασών έχει αυξηθεί εντυπωσιακά. Τα τελικά προϊόντα της αποικοδόμησης της ξυλάνης που χρήζουν μεγάλης σπουδαιότητας στις εμπορικές εφαρμογές είναι η φουρφουρόλη και η ξυλιτόλη. Η ξυλάνη μπορεί να μετατραπεί στο β-D-ξυλοπυρανοζυλίου και τους ολιγοσακχαρίτες της μέσω δύο τύπων υδρολύσεων: όξινης ή ενζυμικής. Η όξινη υδρόλυση προτιμάται συχνά επειδή είναι γρηγορότερη, αλλά συνοδεύεται από το σχηματισμό τοξικών ενώσεων που μπορούν να εμποδίσουν την επόμενη μικροβιακή ζύμωση. Επιπλέον, μακροπρόθεσμα, μπορεί να οδηγήσει στη διάβρωση του μεταλλικού εξοπλισμού που έρχεται σε επαφή με το οξύ. Πρόσφατα, μερικές

βιομηχανικές επιχειρήσεις έχουν παρουσιάσει ενδιαφέρον για την ανάπτυξη των αποδοτικών ενζυμικών διαδικασιών για να χρησιμοποιηθεί αντί της όξινης υδρόλυσης στην επεξεργασία του υλικού που περιέχει την ημικυτταρίνη.

Οι εμπορικές ξυλανάσες παράγονται βιομηχανικά, σε πολλές χώρες, όπως στην Ιαπωνία, στην Φινλανδία, στην Γερμανία, στην Δημοκρατία της Ιρλανδίας, στην Δανία, στον Καναδά και στις ΗΠΑ. Οι μικροοργανισμοί που συνήθιζαν να παράγουν αυτά τα ένζυμα είναι τα γένη *Aspergillus niger*, *Trichoderma sp.* και *Humicola insolens*. Εντούτοις, οι εμπορικές ξυλανάσες μπορούν επίσης να απομονωθούν από τα βακτηρια. Η ξυλανάση άρχισε να χρησιμοποιείται στη δεκαετία του '80: αρχικά κατά την προετοιμασία της ζωικής τροφής και αργότερα στις βιομηχανίες τροφίμων, κλωστοϋφαντουργικών προϊόντων και χαρτιού. Στις μέρες μας, οι ξυλανάσες και οι κυτταρινάσες μαζί με τις πηκτινάσες, αποτελούν το 20% της αγοράς των ενζύμων στον κόσμο.

#### **1.1.6.1.1. Οι ξυλανάσες στη ζωική τροφή**

Η χρήση των ενζύμων στην παραγωγή της τροφής είναι ένας σημαντικός τομέας της βιομηχανίας μεταποίησης αγροτικών προϊόντων, με μια ετήσια παγκόσμια παραγωγή που υπερβαίνει τους 600 εκατομμύρια τόνους και έναν κύκλο εργασιών μεγαλύτερο από 50 δισεκατομμύρια δολάρια. Οι ξυλανάσες χρησιμοποιούνται στη ζωική τροφή μαζί με τις γλυκανάσες, τις πηκτινάσες, τις κυτταρινάσες, τις πρωτεάσες, τις αμυλάσες, τις φυτάσες, τις γαλακτοζιδάσες και τις λιπάσες. Αυτά τα ένζυμα προκαλούν βλάβη στις αραβινοξυλάνες των συστατικών της τροφής, που μειώνουν το ιξώδες της πρώτης ύλης. Οι αραβινοξυλάνες που βρίσκονται στα κυψελοειδή τοιχώματα των σιταριών έχουν μια αντί-θρεπτική επίδραση στα πουλερικά. Όταν τέτοια συστατικά είναι παρόντα με διαλυτή μορφή, μπορούν να αυξήσουν το ιξώδες της ληφθείσας τροφής, που παρεμποδίζει την κινητικότητα και την απορρόφηση άλλων συστατικών. Εάν η ξυλανάση προστίθεται στην τροφή που περιέχει αραβόσιτο και σόργο, όπου και τα δύο είναι τρόφιμα με χαμηλό ιξώδες, μπορεί να βελτιώσει την πέψη των θρεπτικών ουσιών στο αρχικό μέρος της πεπτικής οδού, με αποτέλεσμα την αποδοτικότερη κατανάλωση της ενέργειας που απελευθερώνεται από την τροφή. Τα μικρά των πτηνών και των χοίρων παράγουν

ενδογενή ένζυμα σε μικρότερες ποσότητες από τις αντίστοιχες των ενηλίκων, για αυτό τα συμπληρώματα τροφών που περιέχουν εξωγενή ένζυμα θα πρέπει να έχουν βελτιωμένη απόδοση. Επιπλέον, η προσθήκη των εξωγενών ενζύμων έχει τη δυνατότητα να μειώνει τα ανεπιθύμητα υπολείμματα στα περιττώματα (φώσφορος, άζωτο, χαλκός και ψευδάργυρος), μια επίδραση που θα μπορούσε να έχει έναν ρόλο στη μείωση της περιβαλλοντικής μόλυνσης.

#### **1.1.6.1.2. Κατασκευή του ψωμιού, των τροφίμων και των ποτών**

Οι ξυλανάσες μπορούν να υιοθετηθούν στην αρτοποιία, από κοινού με την αμυλάση, την οξειδάση της γλυκόζης και τις πρωτεάσες. Οι ξυλανάσες, όπως και οι άλλες ημικυτταρινάσες, διαλύουν την ημικυτταρίνη στο αλεύρι σίτου, βοηθώντας στην ανακατανομή του νερού και αφήνοντας την ζύμη μαλακότερη και ευκολότερη να ζυμωθεί. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ψησίματος του ψωμιού, καθυστερούν το σχηματισμό ψίχουλου, επιτρέποντας έτσι στη ζύμη να «διογκωθεί». Με τη χρήση των ξυλανασών, επιτυγχάνεται η αύξηση στον όγκο του ψωμιού, μεγαλύτερη απορρόφηση του νερού και βελτιωμένη αντίσταση στη ζύμωση. Επίσης, ένα μεγάλο ποσοστό αραβινοξυλοολιγοσακχαριτών στο ψωμί θα ήταν ευεργετικό στην υγεία. Για την παρασκευή των μπισκότων, η ξυλανάση συστήνεται για την κατασκευή λεπτότερων cream crackers και για τη βελτίωση της σύστασης, της ωραίας γεύσης και την ομοιομορφία των γκοφρετών.

Οι βιομηχανίες χυμού και κρασιού αποτελούν ένα σημαντικό μέρος στην ενζυμική αγορά. Η παραγωγή των χυμών φρούτων και λαχανικών απαιτεί μεθόδους εξαγωγής, καθαρίσματος και σταθεροποίησης. Στη δεκαετία του '30, όταν ξεκίνησε η κατασκευή των χυμών από φρούτα εσπεριδοειδών, οι παραγωγές ήταν χαμηλές και προβλήματα αντιμετωπίζονταν στη διήθηση του χυμού, εξαιτίας της θολερότητάς του. Η αύξηση της γνώσης των χημικών συστατικών των φρούτων και η χρήση των μικροβιακών ενζύμων βοήθησε στο να λυθούν αυτά τα προβλήματα. Σήμερα, οι ξυλανάσες, από κοινού με τις κυτταρινάσες, τις αμυλάσες και τις πηκτινάσες, οδηγούν σε μια βελτιωμένη παραγωγή των χυμών με τη βοήθεια της ρευστοποίησης των φρούτων και των λαχανικών, στην σταθεροποίηση του πολτού των φρούτων, στην αύξηση της αποκατάστασης των αρωμάτων, ουσιαστικών



ελαίων, βιταμινών, ορυκτών αλάτων, εδώδιμων χρωστικών ουσιών, στην μείωση του ιξώδους, στην υδρόλυση των ουσιών που εμποδίζουν τον φυσικό ή τον χημικό καθαρισμό του χυμού, ή όταν μπορεί να προκαλέσει θολερότητα στη συμπύκνωση. Η ξυλανάση σε σχέση με την ενδογλουκανάση, συμμετέχει στην υδρόλυση της αραβινοξυλάνης και του αμύλου, χωρίζοντας και απομονώνοντας τη γλουτένη από το άμυλο στο αλεύρι σίτου. Οι κύριες επιθυμητές ιδιότητες των ξυλανασών για τη χρήση στη βιομηχανία τροφίμων είναι η υψηλή σταθερότητα και βέλτιστη ενεργότητα σε ένα όξινο pH.

Με την πρόοδο της μοριακής βιολογίας ανακαλύπτονται και άλλες χρήσεις των ξυλανασών. Πρόσφατα, μια ανασυνδυασμένη ζύμη η οποία χρησιμοποιείται για την παραγωγή κρασιού, κατασκευάστηκε από τον *Aspergillus nidulans*, *xlnA*, με το γονίδιο για την ξυλανάση, με αποτέλεσμα να παραχθεί ένα κρασί με εντονότερο άρωμα. Κατά τη διάρκεια της κατασκευής της μπίρας, το κυψελοειδές τοίχωμα του κριθαριού υδρολύεται απελευθερώνοντας μακριές αλυσίδες των αραβινοξυλανών που αυξάνουν το ιξώδες της μπίρας το οποίο καθιστά το «λασπώδες» στην εμφάνιση. Κατά συνέπεια, οι ξυλανάσες χρησιμοποιούνται για να υδρολύσουν τις αραβινοξυλάνες στους μικρότερους ολιγοσακχαρίτες που μικραίνουν το ιξώδες της μπίρας και συνεπώς αποβάλλουν τη λασπώδη πτυχή του.

#### **1.1.6.1.3. Φαρμακευτικές και χημικές εφαρμογές**

Οι ξυλάνες και οι ξυλανάσες χρησιμοποιούνται ελάχιστα στη βιομηχανία φαρμάκων. Οι ξυλανάσες προστίθεται μερικές φορές σε συνδυασμό με ένα σύμπλεγμα ενζύμων (ημικυτταρινάσες, πρωτεάσες και άλλα) ως διαιτητικό συμπλήρωμα ή για την αντιμετώπιση της δυσπεψίας.

Τα υδρολυτικά προϊόντα της ξυλάνης, όπως μονάδες του β-D-ξυλοπυρανοζυλίου, μπορούν να μετατραπούν σε υγρά καύσιμα (αιθανόλη), σε διαλύτες και σε τεχνητές γλυκαντικές ουσίες χαμηλών θερμίδων. Τα πρώτα βήματα είναι η απολιγνοποίηση των υλικών της ημικυτταρίνης πλούσιας σε ξυλάνη, που ακολουθείται από την υδρόλυση από τις ξυλανάσες και τις ημικυτταρινάσες, για να παραγάγει τις ζάχαρες όπως οι μονάδες β-D-ξυλοπυρανοζυλίου. Έπειτα, τα προϊόντα είναι ζυμωνομένα, κυρίως από ζύμες (*Pichia shehatae stipitis* και

*Candida*), για να παραγάγουν ξυλιτόλη ή αιθανόλη. Μεταξύ των σακχάρων που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή της αιθυλικής αλκοόλης, τα κατάλοιπα β-D-ξυλοπυρανοζυλίου αντιπροσωπεύουν το 5 με 20%. Η ξυλιτόλη είναι πολυαλκοόλη που έχει την ιδιότητα της γλύκανσης σε σύγκριση με αυτήν της σακχαρόζης. Είναι μια γλυκαντική ουσία η οποία δεν προκαλεί τερηδόνα, κατάλληλη για τα διαβητικά και παχύσαρκα άτομα, για την πρόληψη της οστεοπόρωσης και των αναπνευστικών μολύνσεων, την αναταραχή του μεταβολισμού των λιπιδίων, τα νεφρικά και τα παρεντερικά τραύματα. Ποικίλα εμπορικά προϊόντα που περιέχουν ξυλιτόλη, όπως η τσίχλα, μπορούν να βρεθούν στην αγορά. Αν και η ενζυματική υδρόλυση της ξυλάνης είναι μια υποσχόμενη μέθοδος που περιέχει β-D-ξυλοπυρανοζυλίου μονάδες, αυτή τη στιγμή η εμπορική ξυλιτόλη παράγεται σε μια μεγάλη κλίμακα από χημική κατάλυση. Αυτή η διαδικασία θεωρείται διαδικασία υψηλού κόστους, κυρίως επειδή η ξυλόζη πρέπει να καθαριστεί αρχικά σε διάφορα βήματα. Εκτός από αυτό, οι χημικές αντιδράσεις παράγουν συχνά τοξικά υποπροϊόντα στη ζύμωση. Πράγματι, στην αποσύνθεση του λιγνοκυτταρινικού υλικού, εκτός από την απελευθέρωση των σακχάρων, τα προϊόντα μπορούν να διαμορφωθούν έτσι που να παράγονται από την υποβάθμιση της γλυκόζης (υδροξυμεθυλοφουρφουράλη), ξυλόζης (φουρφουρόλη) και λιγνίνης (αρωματικές και φαινολικές ενώσεις και αλδεΐδες). Ουσίες που ελευθερώθηκαν από τη δομή της λιγνοκυτταρίνης, όπως το οξικό οξύ και το υλικό που αποσπάται (π.χ. τερπένια και τα παράγωγά τους, tropolones και φαινολικές ενώσεις όπως φλαβονοειδή, στιλβένια, οι κινόνες, λιγνάνες και οι τανίνες), ή από τον εξοπλισμό (σίδηρος, χρώμιο, νικέλιο και χαλκός), μπορούν να είναι ισχυροί ανασταλτικοί παράγοντες της μικροβιακής δραστηριότητας. Η ανάπτυξη μιας πιο κατάλληλης τεχνολογίας για την παραγωγή της ξυλιτόλης έχει δημιουργήσει μια μεγάλη ελπίδα για την ευρύτερη χρήση της στις φαρμακευτικές βιομηχανίες καθώς και στις βιομηχανίες τροφίμων.

#### **1.1.6.1.4. Κλωστοϋφαντουργικά προϊόντα**

Το ξυλανολυτικό σύστημα μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη βιομηχανία κλωστοϋφαντουργίας για την επεξεργασία φυτικών ινών, όπως λινάτσας ή λινού. Για αυτόν το λόγο, η ξυλανάση πρέπει να είναι χωρίς κυτταρινολυτικά ένζυμα, κάτι

το οποίο μπορεί να επιτευχθεί με την επώαση ξηρών μίσχων ramee (χλόη της Κίνας) με την ξυλανάση, έτσι ώστε οι μακριές ίνες της κυτταρίνης να απελευθερωθούν άθικτες. Μετά από την χρησιμοποίηση αυτής της μεθόδου, δεν υπάρχει καμία ανάγκη να χρησιμοποιηθεί το ισχυρό βήμα λεύκανσης, δεδομένου ότι η λιγνίνη δεν υποβάλλεται σε οξείδωση, η οποία θα οδηγούσε στο να σκουρύνει τις ίνες. Σχετικά λίγη έρευνα έχει γίνει για την ενζυμική προετοιμασία των υφαντικών ινών, και όμως αυτό φαίνεται να είναι μια υποσχόμενη αγορά που απαιτεί την ανάπτυξη νέων τεχνικών.

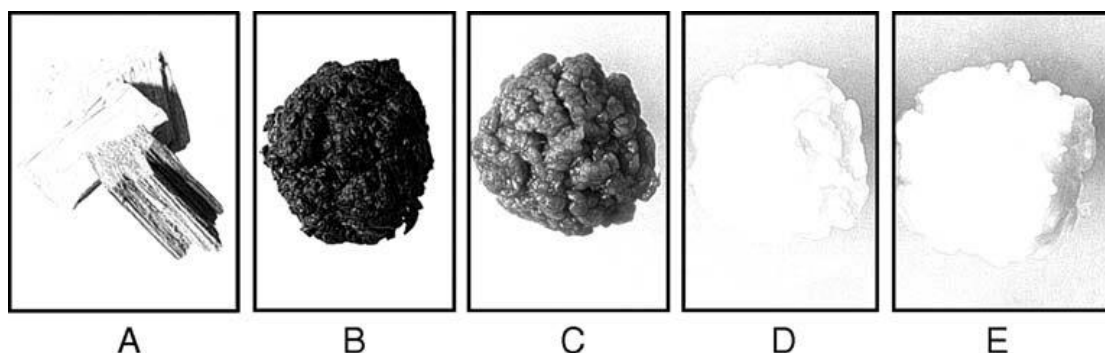
#### **1.1.6.1.5. Πολτός και χαρτί κυτταρίνης**

Η κύρια βιομηχανική εφαρμογή των ξυλανασών είναι στη λεύκανση του πολτού κυτταρίνης. Τα ένζυμα άρχισαν να χρησιμοποιούνται σε αυτόν τον τομέα κατά τη διάρκεια των τελευταίων δύο δεκαετιών, όπου από τότε υπεροξιδάσες εφαρμόζονταν στην αποικοδόμηση της λιγνίνης. Στις μέρες μας σε πολλές χώρες, η χημική διαδικασία, παρά η ενζυμική υδρόλυση, υιοθετείται στην κατασκευή χάρτου. Αυτή η μέθοδος είναι γνωστή ως διαδικασία Kraft. Τρία είδη του *Eucalyptus* (*E. Grandis*, *E. saligna* και *E. urophylla*) προτιμούνται ιδιαίτερα ως πρώτη ύλη.

Η μέθοδος αρχίζει με το μαγείρεμα των ροκανιδιών του ξύλου (Εικ 7α) όπου η διεργασία πραγματοποιείται σε διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου και σουλφιδίου του νατρίου, κάτω από 8 kgf/cm<sup>2</sup> και περίπου στους 165°C για δύο ώρες, σε δεξαμενή χώνευσης. Ο πολτός που σχηματίζεται έχει χαρακτηριστικό καφέ χρώμα, το οποίο οφείλεται κατά κύριο λόγο στην παρουσία υπολειμμάτων λιγνίνης καθώς και παραγώγων της (Εικ 7β). Μπορεί να υποτεθεί ότι το 90-95% της ημικυτταρίνης και της λιγνίνης διαλύονται και μερικώς αποικοδομούνται κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας.

Στο επόμενο στάδιο πραγματοποιείται η προ-λεύκανση, όπου γίνεται η αφαίρεση των δευτερευουσών ακαθαρσιών από τον πολτό. Ένα μέρος του πολτού έχει σκούρο χρώμα αφού μετά το ξέπλυμα δεν αφαιρείται ολή η λιγνίνη. Σε αυτήν την διαδικασία χρησιμοποιείται το οξυγόνο (Εικ 7γ), με στόχο να μειώσει το κόστος των άλλων αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται στη διαδικασία της λεύκανσης. Ο πολτός ο οποίος έχει προλευκανθεί, έχει έναν υποκίτρινο χρώμα και δεν είναι

ακόμα κατάλληλος για την παραγωγή καλής ποιότητας χαρτιού για την εκτύπωση ή το γράψιμο. Αυτό το λέκιασμα οφείλεται στο κατάλοιπο της λιγνίνης που έχει μείνει στα τοιχώματα των ινών. Στο επόμενο βήμα λεύκανσης, η κόλλα επιτυγχάνει ένα καθαρό άσπρο χρώμα, μέσω της απομάκρυνσης των ουσιών που δεν έχουν απορροφηθεί πλήρως (χρωμοφόρων) και είναι διαμορφωμένες από τα προϊόντα της διάσπασης της λιγνίνης. Η διαδικασία λεύκανσης μπορεί να διαιρεθεί σε τρία στάδια. Στον πρώτο, χρησιμοποιείται το όζον και το διοξείδιο του χλωρίου (Εικ 7δ), στο δεύτερο στάδιο, το υδροξείδιο του νατρίου, το οξυγόνο και το υπεροξείδιο του υδρογόνου ενώ στο τελευταίο στάδιο πραγματοποιείται μια άλλη επεξεργασία με το διοξείδιο του χλωρίου (Εικ 7ε).



**Εικόνα 7α-ε:** Στάδια της λεύκανσης του πολτού κυτταρίνης για την παραγωγή χαρτιού. Ξύλινα ξέσματα (ροκανίδια) (α), πτυχή του πολτού κυτταρίνης μετά από τη διαδικασία της Kraft (β), στάδιο της προ-λεύκανσης μέσω της χρήσης του οξυγόνου (γ), πολτός κυτταρίνης που λευκαίνεται με το διοξείδιο όζοντος και χλωρίου (δ), στάδιο που χρησιμοποιεί το διοξείδιο χλωρίου μόνο, μετά από την περίοδο επεξεργασίας με το υδροξείδιο νατρίου, το υπεροξείδιο υδρογόνου και το οξυγόνο (ε)

Το κύριο πλεονέκτημα της διαδικασίας Kraft είναι η δυνατότητα ανάκτησης των χημικών προϊόντων από το μαύρο ποτό. Εντούτοις, δεν ανακτούν όλες οι βιομηχανίες το υδροξείδιο νατρίου και άλλα οργανικά υλικά που βρίσκονται στο μαύρο ποτό. Αφ' ετέρου, τα μειονεκτήματα είναι οι υψηλές αρχικές δαπάνες, η ισχυρή μυρωδιά των αερίων που αναδίδεται με τη διαδικασία, η χαμηλή παραγωγή (40-50%) και το υψηλό κόστος της λεύκανσης. Μπορεί κανείς να δει ότι στην

διαδικασία της Kraft ρυπογόνα αντιδραστήρια χρησιμοποιούνται σε μεγάλες ποσότητες. Η χρήση του χλωρίου οδηγεί στην παραγωγή οργανοχλωρίνων από τα προϊόντα της αποικοδόμησης της λιγνίνης, τα οποία είναι ιδιαίτερα τοξικά και μεταλλαξιογόνα, απαιτώντας την επεξεργασία των αποβλήτων αποχέτευσης από τις εγκαταστάσεις κατασκευής χάρτου. Οι περιβαλλοντικοί κανονισμοί έχουν περιορίσει τη χρήση των ενώσεων χλωρίου στην διαδικασία λεύκανσης στις βιομηχανίες χαρτιού και κυτταρίνης, ειδικά στη δυτική Ευρώπη και τη Βόρεια Αμερική. Ειδική προσοχή έχει δοθεί στη χρησιμοποίηση της ξυλανάσης στην προ-λεύκανση, η οποία θα χαμήλωνε το ποσό από τις ενώσεις χλωρίου που χρησιμοποιήθηκαν μέχρι 30%, έτσι ώστε η μείωση έως και 15 - 20% των οργανοχλωρίων στα απόβλητα αποχέτευσης να μπορούσε να επιτευχθεί. Η χρησιμοποίηση των ξυλανασών μπορεί να οδηγήσει στην αντικατάσταση 5-7 κιλών του διοξειδίου χλωρίου ανά τόνο του πολτού της Kraft και μέση πτώση 2-4 μονάδων στον kappa αριθμό, ένα μέτρο της περιεκτικότητας της λιγνίνης στον πολτό κυτταρίνης. Οι ξυλανάσες που υιοθετούνται στην τεχνολογία χαρτιού δεν χρειάζεται να καθαριστούν, αλλά πρέπει να είναι ενεργές στις υψηλές θερμοκρασίες και σε αλκαλικό pH, και δεν πρέπει να περιέχουν κυτταρινολυτικά ένζυμα με σκοπό να συντηρήσουν τις ίνες της κυτταρίνης. Η αποδοτικότητα της μικροβιακής ξυλανάσης στη διαδικασία λεύκανσης έχει μελετηθεί για διάφορους μικροοργανισμούς όπως τους *Streptomyces thermoviolaceus* (Garg et al. 1996), *Streptomyces roseiscleroticus* (Patel et al. 1993), *Streptomyces sp.* (Beg et al. 2000, Georis et al. 2000), *Streptomyces galbus* (Kansoh and Nagieb 2004), *Bacillus sp.* (Kulkarni and Rao 1996, Shah et al. 1999), *Bacillus pumilus* (Bim and Franco 2000, Duarte et al. 2003), *Bacillus circulans* (Dhillon et al. 2000), *Aspergillus kawachii* (Tenkanen et al. 1997), *Aspergillus oryzae* (Christov et al. 1999), *Aspergillus niger* (Zhao et al. 2002), *Aspergillus nidulans* (Taneja et al. 2002), *Aspergillus fumigatus* (Lenartovicz et al. 2002), *Chaetomium cellulolyticum* (Baraznenok et al. 1999), *Thermomyces lanuginosus* (Haarhoff et al. 1999), *Trichoderma reesei* (Oksanen et al. 2000), *Acrophilophora nainiana* and *Humicola grisea* (Salles et al. 2004).

Υπάρχουν δύο υποθέσεις για το ρόλο των ξυλανασών στη λεύκανση του πολτού της κυτταρίνης. Στην πρώτη υπόθεση, οι ξυλανάσες δρουν πάνω στις ξυλάνες που είναι υγροποιημένες στην λιγνίνη. Αυτές οι ξυλάνες υγροποιούνται λόγω της

μείωσης του pH στο τέλος του μαγειρικού σταδίου. Η αφαίρεσή τους από τη δράση των ξυλανασών θα άφηνε την λιγνίνη περισσότερο εκτεθειμένη στις ενώσεις που χρησιμοποιούνται στη λεύκανση του πολτού της κυτταρίνης. Η δεύτερη υπόθεση βασίζεται στη δυνατότητα της λιγνίνης να παράγει σύμπλοκα με τους πολυσακχαρίτες όπως για παράδειγμα με την ξυλάνη, και στο γεγονός ότι μερικοί από τους δεσμούς είναι ανθεκτικοί στα αλκάλια και μπορεί να μην έχουν υδρολυθεί κατά τη διάρκεια της διαδικασίας Kraft. Οι ξυλανάσες δρουν διασπώντας τις γέφυρες που έχουν απομείνει μεταξύ λιγνίνης και ξυλάνης, ανοίγοντας τη δομή του πολτού της κυτταρίνης και οδηγώντας στον τεμαχισμό της ξυλάνης και σε επόμενες εξαγωγές των τεμαχίων. Η επεξεργασία με τις ξυλανάσες καθιστά τον πολτό πιο διαπερατό σε επόμενες χημικές εξαγωγές του κατάλοιπου καφέ λιγνίνης και υδατάνθρακες λιγνίνης από τις ίνες. [Polizeli et al, 2005]

Table 6  
Potential applications for xylanases

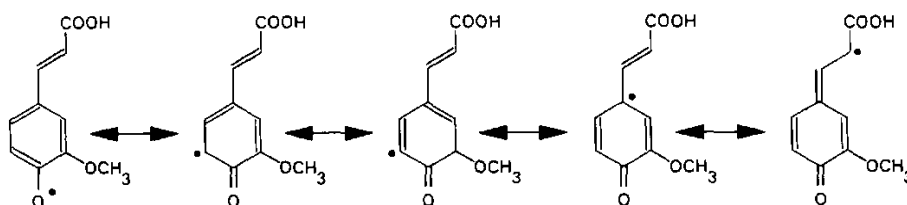
Market	Industry	Application	Function
Food	Fruit and vegetable processing, brewing, wine production.	Fruit and vegetable juices, nectars and purees, oils (e.g., olive oil, corn oil) and wines	Improves maceration and juice clarification, reduces viscosity. Improves extraction yield and filtration, process performance and product quality.
	Baking	Dough and bakery products	Improves elasticity and strength of the dough, thereby allowing easier handling, larger loaf volumes and improved bread texture.
Feed	Animal feeds.	Monogastric (swine and poultry) and ruminant feeds	Decreases the content of non-starch polysaccharides, thereby reducing the intestinal viscosity and improving the utilization of proteins and starch. Improves animal performance, increases digestibility and nutritive value of poorly degradable feeds, e.g., barley and wheat.
Technical	Paper and pulp	Biobleaching of kraft pulps	Reduces chlorine consumption and toxic discharges.
		Bio-mechanical pulping	Facilitates the pulping process and reduces the use of mechanical pulping methods, hence reduces energy consumption.
		Bio-modification of fibers	Improves fibrillation and drainage properties of pulp, hence improving the process efficiency and the paper strength.
	Starch	Bio-de-inking	Facilitates the de-inking process and reduces the use of alkali.
		Starch-gluten separation	Reduces batter viscosity, improves gluten agglomeration and process efficiency.
		Retting of flax, jute, ramie, hemp, etc.	Enzymatic retting, reduces/replaces chemical retting methods.
	Bioremediation/Bioconversion	Treatment of agricultural, municipal and food industry wastes	Treatment/recycling of wastes. Production of fermentable products, renewable fuel (bioethanol) and fine chemicals.

**Εικόνα 8:** Συνοπτικός πίνακας εφαρμογών της ξυλανάσης

### 1.1.6.2. Εστεράσεις

#### 1.1.6.2.1. Απελευθέρωση φερουλικού οξέος

Πρόσφατα έχει εκδηλωθεί ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τις εστεράσεις του φερουλικού οξέος και της πιθανής εφαρμογής τους στην παραλαβή φερουλικού οξέος από αγροτοβιομηχανικά παραπροϊόντα, όπως αυτά που παράγονται από τις βιομηχανίες άλεσης, τη ζυθοποιία και τις βιομηχανίες ζάχαρης. Το φερουλικό οξύ, λόγω της συζυγίας μεταξύ της φαινολικής ομάδας και της ακόρεστης πλευρικής αλυσίδας, είναι ικανό να δημιουργεί δομές συντονισμού, οι οποίες σταθεροποιούνται με τη διασπορά της φαινοξυ-ρίζας (εικόνα 9). Σε αυτή του την ιδιότητα οφείλεται η αντιοξειδωτική του δράση. Το φερουλικό οξύ μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αντιοξειδωτικό, λόγω της δράσης του έναντι περοξυνιτρίτη [Pannala et al., 1998] και της οξειδωμένης χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (oxLDL) *in vitro* [Schroeter et al., 2000]. Επίσης, το φερουλικό οξύ έχει εκτιμηθεί ως αντιοξειδωτικό σε συναπτοσώματα και νευρωνικές καλλιέργειες που είχαν προσβληθεί από υπεροξυ και υδροξυ ρίζες μέσω διάφορων δεικτών οξειδωτικού στρες και μπορεί να αποτελέσει ένα πολλά υποσχόμενο αντιοξειδωτικό παράγοντα έναντι νευροεκφυλιστικών διαταραχών, όπως είναι η νόσος Alzheimer's [Kanski et al., 2002].



**Εικόνα 9:** Σταθεροποίηση της φαινοξυ-ρίζας του φερουλικού οξέος λόγω δομών συντονισμού

Η πιθανή χρήση του φερουλικού οξέος ως πρώτης ύλης για τη βιοκαταλυτική μετατροπή του σε άλλα προϊόντα υψηλής αξίας, όπως σε στυρένια, πολυμερή,

εποξειδία αλκυλ-βενζολίων, παράγωγα του βανιλλικού οξέος, κατεχόλες του πρωτοκατεχοϊκού οξέος, κατεχόλες, γουαϊακόλη και βαννιλίνη, παρουσιάζει αυξανόμενο ενδιαφέρον [Rosazza et al., 1995]. Η τελευταία είναι και μία από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες ανά τον κόσμο αρωματικές ουσίες στη βιομηχανία τροφίμων, φαρμάκων και καλλυντικών [Priefert et al., 2001].

Ο τύπος της ξυλανάσης, που χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με τις εστεράσες του φερουλικού οξέος, επηρεάζει τόσο την ποσότητα όσο και τη μορφή του φερουλικού οξέος που απελευθερώνεται. Συγκεκριμένα, οι ξυλανάσες της οικογένειας 11 είναι περισσότερο αποτελεσματικές στην υδρόλυση φερουλικού οξέος, ενώ οι ξυλανάσες της οικογένειας 10 είναι πιο αποτελεσματικές στην απελευθέρωση διφερουλικού οξέος [Faulds et al., 2003; Faulds et al., 2006].

#### **1.1.6.2.2. Βιομηχανία χάρτου**

Οι εστεράσες του φερουλικού οξέος προτιμώνται ως ένζυμα για την απολιγνινοποίηση μη ξυλωδών φυτών, εφόσον υδρολύουν τις γέφυρες φερουλικών που συνδέουν τη λιγνίνη με τους υδατάνθρακες στο κυτταρικό τοίχωμα των φυτών διάφορων μονοκοτυλήδων και δικοτυλήδων φυτικών οργανισμών. Εάν χρησιμοποιηθούν συνεργιστικά με ξυλανάσες και άλλα ένζυμα που υδρολύουν τη ξυλάνη στις διεργασίες βιοπολοποίησης και βιολεύκανσης του χαρτοπολτού, οι εστεράσες του φερουλικού οξέος μπορούν να διασπάσουν και να ελαφρύνουν τη δομή του κυτταρικού τοιχώματος. Το σύμπλεγμα λιγνίνης-υδατανθράκων καθίσταται περισσότερο ευάλωτο σε ενζυμικές προσβολές και η διάλυση και διάχυση των προϊόντων αποικοδόμησης περισσότερο αποτελεσματική σε αλκαλικές συνθήκες. Η αυξημένη δυνατότητα εκχύλισης της λιγνίνης οδηγεί σε μείωση της κατανάλωσης χλωρίου στο στάδιο λεύκανσης που ακολουθεί και να βελτιώσει τη στιλπνότητα του πολτού. Η ανασυνδυασμένη εστεράση (από τον *A. niger*) μελετήθηκε ως προς τη λεύκανση πολτού άχυρου σίτου με ή χωρίς την παρουσία συστήματος λακκάσης και ξυλανάσης [Record et al., 2003]. Βέλτιστα αποτελέσματα προέκυψαν όταν χρησιμοποιήθηκε διεργασία δύο διαδοχικών σταδίων, που περιελάμβαναν ξυλανάση, την εστεράση FAEA και λακκάση, δίνοντας μεγάλη απόδοση απολιγνινοποίησης της τάξης του 75% και αριθμό kappa 3,9. Ο αριθμός kappa αποτελεί ποσοτικό μέγεθος της λιγνίνης που περιέχεται στους προς λεύκανση



χαρτοπολτούς. Η δράση της ίδιας εστεράσης σε συνδυασμό με ξυλανάσες οδήγησε σε μείωση του αριθμού *karra* κατά 25% πριν τη λεύκανση με υπεροξείδιο [Sigoillot et al., 2005]. Η υψηλή τιμή των πολτών λιναριού, που χρησιμοποιούνται για ειδικά χαρτιά (τετραπλάσια αυτής των πολτών ξύλου), μπορεί να καλύψει το κόστος ενζύμων σε μελλοντικές εφαρμογές βιολεύκανσης. Επίσης, εστεράσες του φερουλικού οξέος από τον *A. niger* χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτόχρονη μετατροπή μη ξυλωδών φυτών σε φαινολικές ουσίες και πολτούς φυτικών ινών [Tarin et al., 2006]. Η ενζυμική επεξεργασία σίτου ελαιόσπορων σπάδικων λιναριού που χρησιμοποιούνται ως πρώτες ύλες στην παραγωγή χάρτου, αύξησαν την ποσότητα των απελευθερούμενων φαινολικών ουσιών, αποικοδόμησε την ημικυτταρίνη και τη λιγνίνη και βελτίωσε τις αλκαλικές συνθήκες επεξεργασίας των πολτών με την αναγωγή του απαραίτητου χημικού φορτίου, που απαιτεί η διεργασία παραγωγής χάρτου.

#### **1.1.6.2.3. Παραγωγή βιοαιθανόλης**

Η παραγωγή βιοαιθανόλης από ανανεώσιμα λιγνοκυτταρινούχα υλικά έχει μελετηθεί εκτενώς τις τελευταίες δεκαετίες. Τα ζυμώσιμα σάκχαρα από την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη είναι απαραίτητως η γλυκόζη και η ξυλόζη και μπορούν να απελευθερωθούν από τα λιγνοκυτταρινούχα υλικά μέσω υδρόλυσης σε ένα ή σε δύο στάδια, δίνοντας μίγματα γλυκόζης και ξυλόζης ή ξεχωριστά μίγματα πλούσια σε γλυκόζη ή ξυλόζη. Οι συμβατικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τη βιομετατροπή της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης σε αιθανόλη, περιλαμβάνουν όξινη ή ενζυμική υδρόλυση των βιοπολυμερών σε διαλυτούς ολιγοσακχαρίτες με ακόλουθη ζύμωσή τους σε αιθανόλη. Έχει διαπιστωθεί μία συνεργιστική δράση μεταξύ κυτταρινασών, εστερασών του φερουλικού οξέος και ξυλανάσων σε κατάλληλες συγκεντρώσεις των ενζύμων αυτών (10 U/g κυτταρινάσης, 3 U/g ξυλανάσης και 10 U/g εστεράσης του φερουλικού οξέος) στη σακχαροποίηση προεπεξεργασμένου πίτυρου σίτου. Το ποσοστό απελευθέρωσης γλυκόζης ήταν 51,4% στους 50°C με την παρουσία ενός μη ιοντικού τασιενεργού, του Tween 20 [Tabka et al., 2006]. Επιπλέον, η παρουσία εστερασών του φερουλικού οξέος του *Aspergillus* (13 mU/assay) και ξυλανάσης του *Trichoderma* (256 U/assay), cellulase action (1024 U/assay) έδωσαν σημαντική απελευθέρωση αναγωγικών σακχάρων

(73,4% επί των συνολικών αναγωγικών σακχάρων) από φλοιούς βρώμης μετά από 24 ώρες επώασης, σε σχέση με την απελευθέρωση αναγωγικών σακχάρων (38,6%) με μόνο τη δράση κυτταρίνης στο ίδιο επίπεδο [Yu et al., 2003]. Η χρήση των σακχάρων της ημικυτταρίνης είναι απαραίτητη για την αποτελεσματική και την οικονομικά συμφέρουσα μετατροπή των λιγνινοκυτταρινούχων υλικών σε καύσιμη βιοαιθανόλη. Οποιαδήποτε ημικυτταρίνη, που περιέχει λιγνινοκυτταρίνη παράγει, μετά την προεπεξεργασία μόνο, ή μετά από συνδυασμό της με ενζυμική υδρόλυση, ένα μίγμα σακχάρων. Από τα φυτά που χρησιμοποιούνται στην Ευρώπη για την παραγωγή πόσιμης αιθανόλης, η οποία βασίζεται στην επεξεργασία ενδοσπερμίου σίτου, παράγεται ένα παραπροϊόν ζύμωσης, το οποίο περιέχει περίπου 66% (w/w) αραβινοξυλάνη [Sorensen et al., 2003]. Μία βελτιωμένη χρήση του ενδοσπερμίου σίτου σε αυτόν τον τύπο παραγωγής αιθανόλης θα ήταν η παραγωγή ζυμώσιμων προϊόντων υδρόλυσης από το κλάσμα της ημικυτταρίνης. Πλήρης ενζυμική υδρόλυση της αραβινοξυλάνης απαιτεί τόσο τον πολυμερισμό όσο και τη διάσπαση πλευρικών ομάδων από ένζυμα, όπως είναι οι εστεράσες του φερουλικού οξέος [Saha, 2003].

#### **1.1.6.2.4. Αγροτικές βιομηχανίες**

Οι διμερείς και τριμερείς μορφές του φερουλικού οξέος που σχηματίζονται με οξειδωτική σύζευξη μεταξύ των εστερικών ή/και αιθερικών παραγώγων του αποτελούν από τους πλέον παρεμποδιστικούς παράγοντες της αποικοδόμησης των συμπλεγμάτων των κυτταρικών τοιχωμάτων των φυτών στα θηλαστικά [Yu et al., 2005a]. Ένα μίγμα ενζύμων που περιέχει και καθαρή εστεράση του *Aspergillus* (13 mU εστεράσης, 4096 U ξυλανάσης, 1024 U κυτταρίνης, 256 U ενδογλουκανάσης I και II και 64 U of β-γλουκανάσης) οδήγησε σε 86% αύξηση της αφομοιωσιμότητας του κυτταρικού τοιχώματος των φλοιών βρώμης και σε σημαντική *in vitro* αποικοδόμηση από τη μικροχλωρίδα της μεγάλης κοιλίας των μηρυκαστικών [Yu et al., 2005b].

Η προεπεξεργασία των χαμηλής αξίας παραπροϊόντων των βιομηχανιών άλεσης όπως είναι το πίτυρο σίτου, αραβόσιτου και ρυζιού και το στέλεχος αραβόσιτου, με ενζυμικά μίγματα που περιέχουν εστεράσες του φερουλικού, μπορεί να τα

καταστήσει περισσότερο εύπεπτα και να αυξήσει τη θερμιδική τους αξία [Chen et al., 1995].

#### **1.1.6.2.5. Βελτιωτικά άρτου**

Το σιτάλευρο περιέχει συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος σε περιεκτικότητα 2-3% (w/w), τα οποία αποτελούνται κυρίως από αραβινοξυλάνες, οι οποίες διακρίνονται σε υδατοδιαλυτά και αδιάλυτα στο νερό κλάσματα. Τα υδατοδιαλυτά κλάσματα παρουσιάζουν μεγάλη ικανότητα κατακράτησης νερού, επομένως αυτό το συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος καθορίζει σε κάποιο βαθμό τα χαρακτηριστικά ζυμώματος και τις ιδιότητες αρτοποιήσης των σιτάλευρων. Οι επιδράσεις αυτές μπορούν να τροποποιηθούν μέσω ενζυμικής αποικοδόμησης [Gruppen et al., 1993] με τη χρήση ενζύμων, όπως είναι οι εστεράσες φερουλικού οξέος, οι αραβινοφουρανοσιδάσες, οι αραβινοφουρανοϋδρολάσες και οι ξυλανάσες. Επιπλέον, το φερουλικό οξύ, λόγω των διασταυρούμενων δεσμών που σχηματίζει με τις πρωτεΐνες στο σίτο [Hoseney & Faubion, 1981], ευθύνεται για το αυξημένο ιξώδες, τις μεγαλύτερες απαιτήσεις σε νερό και γενικά τις αλλαγές στις συνθήκες ανάπτυξης της γλουτένης. Συνεπώς, η καταλυτική ενεργότητα των εστερασών του φερουλικού οξέος, μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στη ζύμωση και τη διεργασία αρτοποιίας του.

#### **1.1.6.2.6. Βιοσυνθετικά εργαλεία**

Τα υδροξυ-κινναμικά οξέα (φερουλικό, π-κουμαρικό, καφεϊκό, σιναπικό) παρουσιάζουν μεγάλο εύρος βιομηχανικών εφαρμογών λόγω των αντιοξειδωτικών τους ιδιοτήτων. Γενικά, τα φυσικά αυτά αντιοξειδωτικά είναι μερικώς διαλυτά σε υδατικά μέσα, περιορίζοντας τις εφαρμογές τους σε λιπόφιλες διεργασίες. Η τροποποίησή τους μέσω εστεροποίησης με αλειφατικές αλκοόλες οδηγεί στη σύνθεση περισσότερο λιπόφιλων προϊόντων διευρύνοντας έτσι το φάσμα των εφαρμογών τους. Με το ίδιο σκεπτικό, αλλά προς την αντίθετη κατεύθυνση, κινείται η τροποποίηση των κινναμικών οξέων μέσω εστεροποίησης με περισσότερο υδρόφιλα μόρια (π.χ. σάκχαρα, γλυκερόλη). Οι εστεράσες του φερουλικού οξέος αποτελούν ένα νέο, χρήσιμο βιοσυνθετικό εργαλείο για την τροποποίηση των οξέων αυτών, κυρίως σε μη συμβατικά (μη υδατικά) συστήματα.

## 2. Σκοπός

Σκοπός της παρούσης εργασίας ήταν η κλωνοποίηση και βελτιστοποιημένη έκφραση της ένδο-β-1,4-ξυλανάσης, **Fo Xyn11– 09638**, από το μεσόφιλο μύκητα *Fusarium oxysporum* στο στέλεχος X33 της ζύμης *Pichia pastoris*. Επίσης έγινε αριστοποίηση της παραγωγής της εστεράσης του φερουλικού οξέος, η οποία κλωνοποιήθηκε και υπερεκφράστηκε από τους Moukoulis et al, 2008. Τέλος συγκρίθηκαν οι παραγωγές των δυο ενζύμων στις βέλτιστες συνθήκες.

## Κεφάλαιο 2<sup>ο</sup> : Υλικά και Μέθοδοι & Μοριακές Τεχνικές

### 2.1. Υλικά

#### 2.1.1. Μικροοργανισμοί

Οι μικροοργανισμοί οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν για την παρούσα εργασία είναι οι εξής:

**A.** Ο μεσόφιλος μύκητας *Fusarium oxysporum* F3, ο οποίος απομονώθηκε από κύμνο (Christakopoulos et al., 1989).

**B.** Τα βακτηριακά στελέχη *Escherichia coli* **TOP10** και *Escherichia coli* **TOP10F'** της Invitrogen. Το στέλεχος *E.coli* TOP10 χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση του φορέα pCR<sup>®</sup> Blunt (Invitrogen), ενώ το TOP10F' για την κλωνοποίηση του πλασμιδιακού φορέα pPICZαC (Invitrogen).

**Γ.** Το στέλεχος X33 της ζύμης *Pichia pastoris* (Invitrogen). Ο μικροοργανισμός *P. pastoris* είναι ένας μονοκύτταρος μεθυλότροφος ζυμομύκητας που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία ως σύστημα ετερόλογης έκφρασης πρωτεϊνών από ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Ως ευκαρυωτικός οργανισμός έχει τα πλεονεκτήματα των ανώτερων συστημάτων έκφρασης, όπως είναι οι μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις. Αποτελεί ένα σύστημα εύκολο στη χρήση,

γρήγορο και με πολύ χαμηλό κόστος, καθώς μπορεί να αναπτύσσεται σε υλικό με μεθανόλη, ως μόνη πηγή άνθρακα. Επιπλέον, ο συγκεκριμένος μύκητας, επειδή εκκρίνει πολύ λίγες δικές του πρωτεΐνες, είναι εύκολη η απομόνωση, συνήθως σε υψηλά επίπεδα, ετερόλογα εκφρασμένων πρωτεϊνικών μορίων.

### **2.1.2. Αντιδραστήρια – Αναλώσιμα υλικά**

Τα χημικά αντιδραστήρια προμηθεύτηκαν από τις εταιρείες Sigma-Aldrich (Η.Π.Α.), LAB-SCAN (Ιρλανδία) και AppliChem (Γερμανία), και η καθαρότητα τους ήταν αναλυτικού βαθμού. Τα πλαστικά και γυάλινα εργαστηριακά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν των εταιρειών Greiner-Bio One (Γερμανία), Sterilin Limited (Ηνωμένο Βασίλειο), SCHOTT AG (Γερμανία), Eppendorf (Γερμανία), Whatman (Ηνωμένο Βασίλειο), Millipore (Η.Π.Α.) και ROTH (Η.Π.Α.).

### **2.1.3. Υλικά και στήλες Χρωματογραφίας**

Τα υλικά χρωματογραφίας που χρησιμοποιήθηκαν είναι προϊόντα της BIORAD (Η.Π.Α.). Στη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC, High Performance Liquid Chromatography) χρησιμοποιήθηκε στήλη αντίστροφης φάσης C-18 Nucleosil (250 mm × 4.6 mm, Macherey-Nagel, Γερμανία).

### **2.1.4. Θρεπτικά μέσα – Ρυθμιστικά διαλύματα**

Για την παρασκευή όλων των θρεπτικών μέσων και των ρυθμιστικών διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε απιονισμένο νερό, σύμφωνα με τα πρωτόκολλα των Ausubel (1998) και Sambrook (1996). Τα διαλύματα των τεχνικών μοριακής βιολογίας, καθώς και της Χρωματογραφίας προετοιμάστηκαν με υπερκάθαρο νερό ( $R=18.2 \text{ M}\Omega\text{cm}^{-1}$ ). Η αποστείρωση των θρεπτικών μέσων για τις καλλιέργειες της *E.coli* και της *P. pastoris* καθώς και των ρυθμιστικών διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στις τεχνικές μοριακής βιολογίας έγινε σε αυτόκαυστο στους  $121^{\circ}\text{C}$ , για 15 λεπτά, υπό πίεση 0.1 mPa. Τα θερμοευαίσθητα υλικά, όπως τα αντιβιοτικά και οι βιταμίνες, παρασκευάστηκαν σε διαλύματα πυκνότερα και

αποστειρώθηκαν με διήθηση από φίλτρα σύριγγος με πόρους διαμέτρου 0.2  $\mu\text{m}$ , ενώ στη συνέχεια προστέθηκαν στα θρεπτικά μέσα στους 50 – 60°C περίπου.

#### Θρεπτικά μέσα

<b>Υγρό Θρεπτικό μέσο <i>F.oxysporum</i></b>	2 g/l $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.3 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.3 g/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 10 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 15.6 g/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 2% (w/v) γλυκόζη, pH 6.0
<b>Στερεό Θρεπτικό μέσο <i>F.oxysporum</i> PDA</b>	3.9% (w/v) άγαρ από ζωμό πατάτας και δεξτρόζη, 0.1% (w/v) εκχύλισμα ζύμης
<b>LB (Luria Bertani) <math>\pm</math> καναμυκίνη</b>	1% (w/v) NaCl, 1% (w/v) τρυπτόνη, 0,5% (w/v) εκχύλισμα ζύμης, pH 7.0 $\pm$ 50 $\mu\text{g/mL}$ καναμυκίνη
<b>LB-άγαρ <math>\pm</math> καναμυκίνη</b>	LB με 1.5% (w/v) άγαρ $\pm$ 50 $\mu\text{g/mL}$ καναμυκίνη
<b>LS LB (χαμηλής αλατότητας LB) <math>\pm</math> zeocin</b>	0.5% (w/v) NaCl, 1% (w/v) τρυπτόνη, 0.5% (w/v) εκχύλισμα ζύμης, pH 7.0 $\pm$ 25 $\mu\text{g/mL}$ ζεοσίνη
<b>LS LB-άγαρ <math>\pm</math> zeocin</b>	LB με 1.5% (w/v) άγαρ $\pm$ 25 $\mu\text{g/mL}$ ζεοσίνη
<b>YPD <math>\pm</math> zeocin</b>	1% (w/v) εκχύλισμα ζύμης, 2% (w/v) πεπτόνη, 2% (w/v) δεξτρόζη $\pm$ 25 $\mu\text{g/mL}$ ζεοσίνη
<b>YPD-άγαρ <math>\pm</math> zeocin</b>	YPD με 2% (w/v) άγαρ $\pm$ 25 $\mu\text{g/mL}$ ζεοσίνη
<b>YPDS <math>\pm</math> zeocin</b>	1% (w/v) εκχύλισμα ζύμης, 2% (w/v) πεπτόνη, 2% (w/v) δεξτρόζη, 1 M σορβιτόλη $\pm$ 25 $\mu\text{g/mL}$ ζεοσίνη
<b>YPDS-άγαρ <math>\pm</math> zeocin</b>	YPDS με 1.5% (w/v) άγαρ $\pm$ 25 $\mu\text{g/mL}$ ζεοσίνη
<b>BMGY</b>	1% (w/v) εκχύλισμα ζύμης, 2% (w/v)

	πεπτόνη, 100 mM P-Δ φωσφορικών, pH 6.0, 1.34% (w/v) YNB, $4 \times 10^{-5}$ % (w/v) βιοτίνη, 1% (v/v) γλυκερόλη
<b>BMMY</b>	1% (w/v) εκχύλισμα ζύμης, 2% (w/v) πεπτόνη, 100 mM P-Δ φωσφορικών, pH 6.0, 1.34% (w/v) YNB, $4 \times 10^{-5}$ % (w/v) βιοτίνη, 0.5% (v/v) μεθανόλη
<b>YNB</b>	34 gr/L YNB χωρίς θειϊκό αμμώνιο και αμινοξέα, 100 gr/L θειϊκό αμμώνιο

#### Ρυθμιστικά και άλλα διαλύματα

<b>TE</b>	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0
<b>TBE (10×)</b>	108 g/l Tris base, 55 g/l βορικό οξύ, 40 mL/l 0.5 M EDTA, pH 8.0
<b>P-Δ δείγματος Ηλεκτροφόρησης αгарόζης (Loading buffer)</b>	900 μL γλυκερόλη 50% (v/v), 100 μL Βρωμοφαινόλη Blue 10×

#### **2.1.5. Ολιγονουκλεοτίδια**

Οι αλληλουχίες των εναρκτηρίων μορίων (primers) η αλλιώς οι εκκινήτες που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση τμημάτων DNA, κατασκευάστηκαν από την Eurofins MWG Operon (Γερμανία) και παρουσιάζονται παρακάτω:

##### ***Fo Xyn11– 09638***

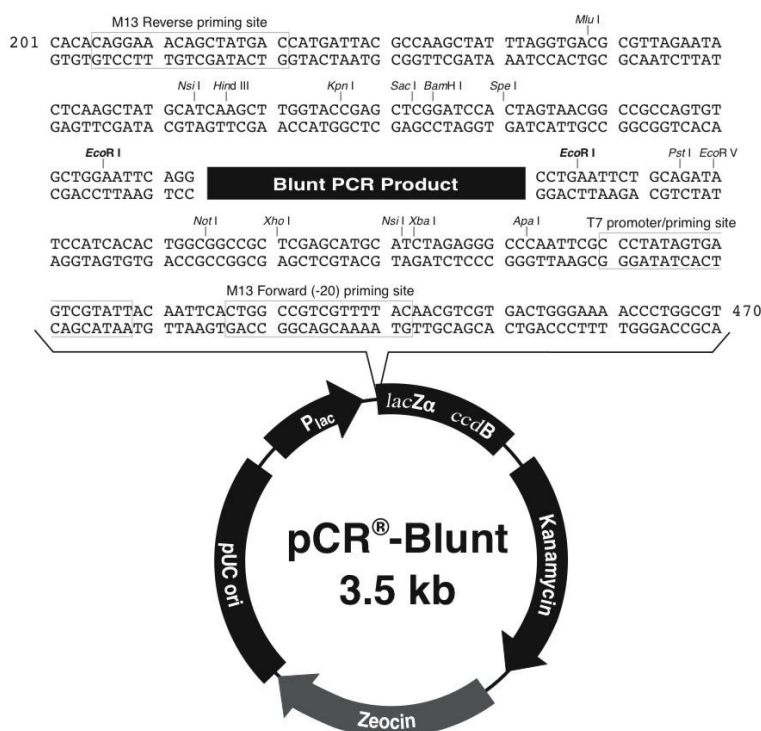
FO_09638F	GCA TCG ATG CTT CCC TCC GCT CAG CCC G
FO_09638R	CGT CTA GAG CCT GGG AGA CAG TCA TGC TGG
09638SPF	CAC CAT CAA GTA CTC TGG
09638SPFR	CGA GAA GTA CCA GGC ATC C

### 2.1.6. Πλασμιδιακοί φορείς κλωνοποίησης και έκφρασης

Οι πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, καθώς και οι χάρτες αυτών παρουσιάζονται παρακάτω:

#### A. pCR® Blunt (Invitrogen)

Ο πλασμιδιακός φορέας αυτός έχει σχεδιαστεί για την κλωνοποίηση τμημάτων DNA που φέρουν ισοτελή άκρα. Το πλασμίδιο pCR® Blunt (3512 bp) περιέχει το γονίδιο θανάτου του *E.coli* *ccdB*, το οποίο βρίσκεται μετά το τέλος του γονιδίου *LacZα*. Όταν γίνεται σύνδεση ενός κομματιού DNA στο πλασμίδιο διακόπτεται η έκφραση του συστήματος *lacZα-ccdB*, με αποτέλεσμα να αναπτύσσονται στο στερεό θρεπτικό μέσο μόνο τα βακτηριακά κύτταρα τα οποία περιέχουν τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια. Αντιστοίχως, κύτταρα που φέρουν μη – ανασυνδυασμένο φορέα είναι αδύνατο να αναπτυχθούν, καθώς σε αυτά εκφράζεται το γονίδιο *ccdB*. Το πλασμίδιο pCR® Blunt περιέχει γονίδια ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά ζεοσίνη και καναμυκίνη.

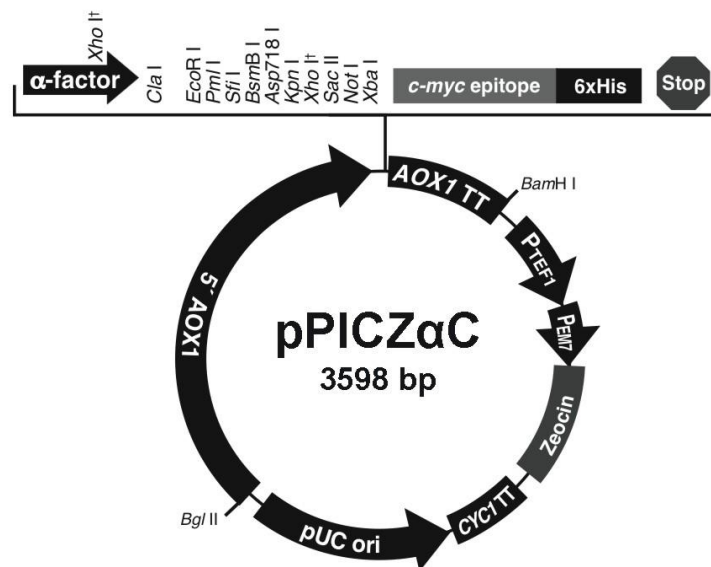


**Εικόνα 10 : Ο χάρτης του πλασμιδίου pCR®-Blunt της Invitrogen**



## B. pPICZαC (Invitrogen)

Ο πλασμιδιακός φορέας κλωνοποίησης pPICZαC (3598 bp) (Invitrogen) που επιλέχθηκε, επιτρέπει την έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών στον μεθυλότροφο ζυμομύκητα *P. pastoris* αλλά και την έκκριση τους στον εξωκυττάριο χώρο με τη χρήση της σηματοδοτικής αλληλουχίας α-factor της ζύμης *Saccharomyces cerevisiae*. Διαθέτει τον ισχυρό υποκινητή AOX1 από το γονίδιο της αλκοολικής οξειδάσης και περιέχει γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό ζεοσίνη (zeocin, Invitrogen, Γαλλία).



**Εικόνα 11:** Ο χάρτης του πλασμιδίου pPICZαC της Invitrogen

## 2.2. Καλλιέργειες κυττάρων

### 2.2.1. Υγρές και στερεές καλλιέργειες βακτηριακών κυττάρων *E.coli*

Χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη *E.coli* TOP10 και TOP10F' τα οποία καλλιεργήθηκαν είτε σε υγρό, είτε σε στερεό θρεπτικό μέσο LB ή LS LB παρουσία

κατάλληλου αντιβιοτικού. Στις υγρές καλλιέργειες η ανάπτυξη των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε αποστειρωμένους σωλήνες όγκου 25 mL μιας χρήσης ή σε μεγαλύτερες φιάλες όταν το απαιτούσε η πειραματική διαδικασία. Η επώαση των κυττάρων έγινε σε περιστρεφόμενους αναδευτήρες με στροφές 200 rpm. Οι στερεές καλλιέργειες παρασκευάστηκαν μετά από την προσθήκη άγαρ στο θρεπτικό μέσο. Στη συνέχεια παρέμειναν και διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία 4°C για διάστημα μερικών εβδομάδων. Για όλες τις καλλιέργειες η θερμοκρασία στην οποία επωάστηκαν τα κύτταρα είναι 37°C και ο χρόνος επώασης είναι 16 περίπου ώρες.

### **2.2.2. Υγρές και στερεές καλλιέργειες κυττάρων του ζυμομύκητα *Pichia pastoris***

Το στέλεχος της ζύμης *P. pastoris* το οποίο χρησιμοποιήθηκε ήταν το X-33 το οποίο είναι μύκητας άγριου τύπου. Το στέλεχος αναπτύχθηκε σε υγρή καλλιέργεια στους 28 – 30°C μέσα σε γυάλινες φιάλες τύπου *baffled* για αύξηση του αερισμού, σε θρεπτικό υλικό YPD, υπό συνεχή ανάδευση (200 rpm). Οι στερεές καλλιέργειες της ζύμης σε τρυβλία, έπειτα από 48 ώρες επώασης στους 30°C, διατηρήθηκαν για λίγες εβδομάδες στους 4°C.

Για τη φύλαξη μετασχηματισμένων και μη μετασχηματισμένων στελεχών της *P. pastoris* για μεγάλα χρονικά διαστήματα στους -20°C και στους -80°C, η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής: μονές αποικίες αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό YPD για περίπου 16 ώρες στους 30°C. Στη συνέχεια τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση και επαναιωρήθηκαν σε διάλυμα YPD, που περιέχει 15% (v/v) γλυκερόλη, έτσι ώστε η τελική OD<sub>600</sub> να είναι 50 – 100 (περίπου  $2.5 - 5.0 \times 10^9$  κύτταρα/mL).

## **2.3. Μοριακές τεχνικές**

### **2.3.1. Κλωνοποίηση – Υπερέκφραση**

#### **2.3.1.1. Απομόνωση DNA από το μικροοργανισμό *Fusarium oxysporum***

Η απομόνωση του ολικού γενομικού DNA από το μύκητα *F.oxysporum* πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται από τους Moukoulis et al., (2008).

#### **2.3.1.2. PCR - (Polymerase Chain Reaction)**

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι μία μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την πολλαπλή αντιγραφή τμημάτων DNA. Για την εφαρμογή της μεθόδου απαιτούνται δύο εκκινητές ολιγονουκλεοτιδίων, το καθένα συμπληρωματικό του κάθε κλώνου του μορίου DNA, σε κατάλληλα σημεία που περιέχουν το κομμάτι DNA που πρόκειται να ενισχυθεί. Η σύνθεση των συμπληρωματικών κλώνων DNA καταλύεται από μια θερμοσταθερή πολυμεράση παρουσία τεσσάρων δεσοξινουκλεοτιδίων (dNTPs). Αρχικά, πραγματοποιείται αποδιάταξη (denaturation) της μήτρας του δίκλωνου DNA, με θέρμανση, ώστε να παραχθούν μονόκλωνα μόρια DNA. Ακολουθεί ψύξη του μίγματος της αντίδρασης σε θερμοκρασία, η οποία επιτρέπει την υβριδοποίηση (annealing) των εναρκτήριων μορίων με τις συμπληρωματικές αλυσίδες της μήτρας DNA και τέλος, πραγματοποιείται επιμήκυνση (extension) των νέων αλυσίδων DNA με την DNA πολυμεράση. Ο κύκλος της αποδιάταξης, αναδιάταξης και επιμήκυνσης επαναλαμβάνεται πολλές φορές και τα προϊόντα κάθε κύκλου ενίσχυσης χρησιμοποιούνται, ως μήτρα DNA στον επόμενο κύκλο. Έτσι, σε κάθε κύκλο, διπλασιάζεται η ποσότητα του επιθυμητού προϊόντος DNA, ώστε στο τέλος  $n$  κύκλων, το διάλυμα της αντίδρασης είναι δυνατόν να περιέχει  $2^n$  μόρια DNA, αντίγραφα της αλληλουχίας η οποία εντοπίζεται μεταξύ των εναρκτήριων μορίων.

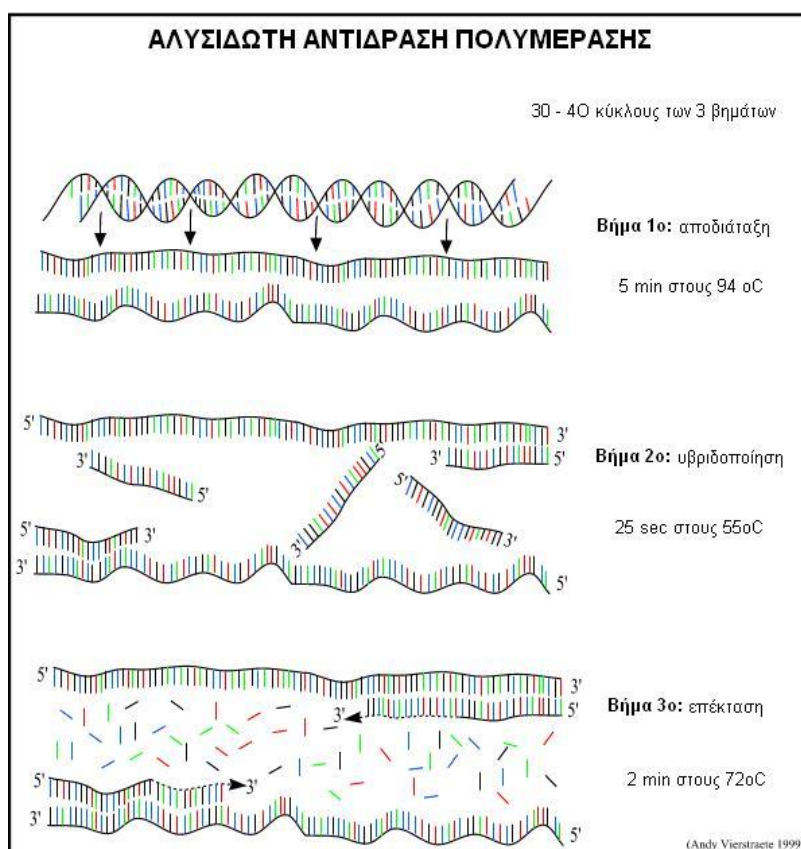
Στην παρούσα εργασία η πολυμεράση που χρησιμοποιήθηκε είναι η **Vent<sub>R</sub>** της **NEB**. Παρακάτω παρουσιάζονται οι συνθήκες και η συνταγή που χρησιμοποιήθηκαν για την συγκεκριμένη πολυμεράση.

- Αποδιάταξη DNA στόχου (denaturation) : 5 min στους 98°C
- Υβριδοποίηση εκκινητών (annealing) : 25 sec στους 55°C
- Επέκταση εκκινητών (extension) : 2 min στους 72°C
- Τελική επέκταση και επιδιόρθωση : 5 min στους 72°C

Οι κύκλοι της αποδιάταξης, της υβριδοποίησης και της επέκτασης ήταν 30.

Για την αντίδραση αναμίχθηκαν σε 40μL υπερκάθολου νερού 1 μL πλασμιδιακού DNA, 1 μL από κάθε εκκινητή, 1 μL dNTPs mix , 1 μL της πολυμέραση και 5 μL ρυθμιστικού διαλύματος της πολυμεράσης (10x).

Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, το προϊόν της PCR αναλύθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.



**Εικόνα 12 : Απεικόνιση των τριών σταδίων της PCR.**

### 2.3.1.3. Πήκτωμα αγαρόζης – Ηλεκτροφόρηση

Η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης στηρίζεται στο γεγονός ότι η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA κατά μήκος των πηκτωμάτων εξαρτάται κυρίως από το μοριακό μέγεθος του DNA και τη συγκέντρωση της αγαρόζης. Όσον αφορά το μοριακό μέγεθος, η ταχύτητα μετακίνησης είναι αντιστρόφως ανάλογη του μεγέθους των κλασμάτων DNA που ηλεκτροφορούνται και της συγκέντρωσης του πηκτώματος. Χρησιμοποιώντας πηκτώματα διαφορετικών συγκεντρώσεων μπορούμε να διαχωρίσουμε ένα μεγάλο εύρος μεγεθών DNA.

#### Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης:

Τα πηκτώματα παρασκευάστηκαν σε κωνική φιάλη με ανάμιξη διαλύματος 52 ml TBE 1x και 0,5 g αγαρόζης. Το μίγμα θερμάνθηκε μέχρι βρασμού ώστε να διαλυθεί η αγαρόζη και αφού κρύωσε προστέθηκε 5  $\mu$ L βρωμιούχου αιθιδίου συγκέντρωσης 1 mg/mL. Στη συνέχεια τοποθετήθηκε στη συσκευή της ηλεκτροφόρησης όπου πολυμερίστηκε σε περίπου 30 λεπτά.

#### Ηλεκτροφόρηση:

Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε θερμοκρασία δωματίου, με ρεύμα σταθερής τάσης 60V. Παράλληλα με το προς εξέταση δείγμα, αναλύεται κατάλληλος μάρτυρας γνωστών μοριακών μεγεθών DNA (Hyperladder I: 200bp-10kb, bioline, H.P.A.). Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία, οπότε διακρίνονται φθορίζουσες ζώνες στις θέσεις όπου έχουν μεταναστεύσει τα μόρια DNA. Το πήκτωμα αγαρόζης φωτογραφίζεται με ψηφιακή μηχανή.

Για το δείγμα “φόρτωσης” αναμίχτηκαν 5  $\mu$ L του προς εξέταση δείγματος, 5  $\mu$ L υπερκάθαρου νερού και 5  $\mu$ L ρυθμιστικού διαλύματος δείγματος ηλεκτροφόρησης αγαρόζης, έτσι ώστε ο συνολικός όγκος να είναι 15  $\mu$ L. Η ποσότητα του μάρτυρα ήταν 7 $\mu$ L. Το τμήμα του DNA που ηλεκτροφορήθηκε απομονώθηκε από το πήκτωμα αγαρόζης με τη βοήθεια των αντιδραστηρίων της **PCR clean up Nucleospin - Extract II**, τα βήματα της οποίας ακολουθούν παρακάτω.

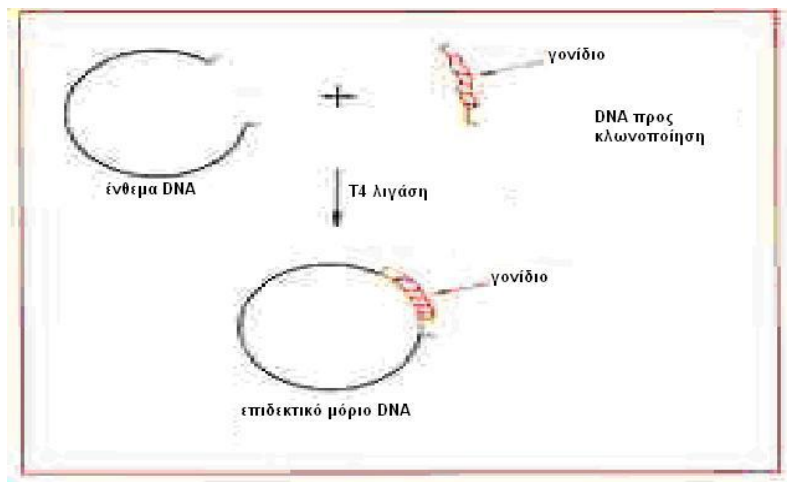
- Κόβονται οι μπάντες στο UV και αφού έχει προζυγιστεί το erpendorf , ζυγίζεται ξανά για να μετρηθεί το απόβαρο.
- Για κάθε 200 mg πηκτώματος αгарόζης προστίθενται 200  $\mu$ L ρυθμιστικό διάλυμα NT. Έπειτα επωάζεται σε θερμαινόμενο αναδευτήρα στους 50°C και στις 800 στροφές για 5 με 10 λεπτά.
- Μεταφέρεται σε στήλη και γίνεται φυγοκέντρηση μια φορά στα 2.5 λεπτά
- Προστίθενται 600  $\mu$ L ρυθμιστικό διάλυμα NT3 και γίνεται φυγοκέντρηση στα 2.5 λεπτά 2 φορές.
- Τοποθετείται η στήλη σε καινούριο erpendorf των 1.5 ml και προστίθενται 30  $\mu$ L Elution Buffer NE. Επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 2 λεπτά και γίνεται φυγοκέντρηση 2 φορές στα 2.5 λεπτά.

#### **2.3.1.4. Διαδικασία κλωνοποίησης τμήματος DNA**

##### **α) Αντίδραση λιγάσης**

Το ένζυμο T4 DNA (T4 ligase) είναι ένα πολυπεπτίδιο που καταλύει το σχηματισμό φωσφοδιεστερικών δεσμών δίκλωνου DNA. Με την αντίδραση αυτή είναι δυνατή η ενσωμάτωση τμήματος cDNA σε γραμμικό πλασμιδιακό DNA με συμπληρωματικά προς αυτά άκρα. Το κυκλικό μόριο που προκύπτει είναι ένα ανασυνδυασμένο πλασμίδιο το οποίο μπορεί να μετασχηματίσει βακτηριακά κύτταρα *E.coli*.

Για την αντίδραση αναμιγνύονται σε σωλήνα τύπου erpendorf όγκου 500  $\mu$ L τα εξής διαλύματα: 2  $\mu$ L ρυθμιστικό διάλυμα της λιγάσης 5x , 1  $\mu$ L λιγάση 5  $\mu$ L προϊόν της PCR, 1  $\mu$ L ένθεμα DNA και 1  $\mu$ L υπερκάθαρο νερό. Μετά από καλή ανάδευση η αντίδραση επωάζεται στους 16°C στην συσκευή της PCR για περίπου 2 ώρες.

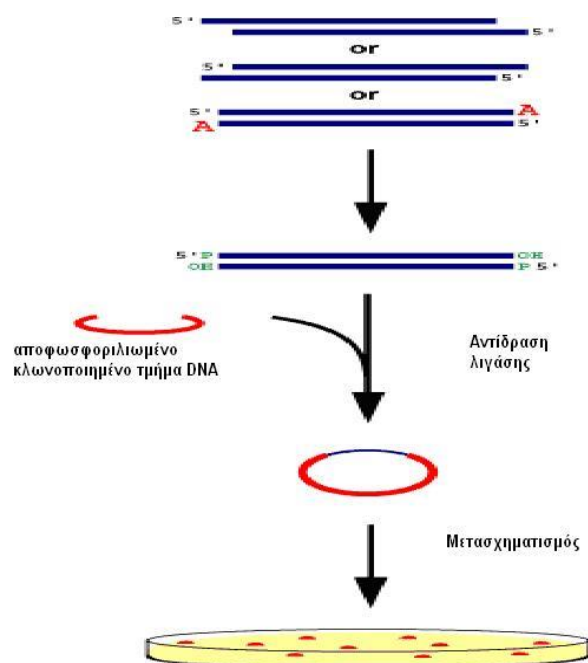


**Εικόνα 13: Απεικόνιση διαδικασίας αντίδρασης λιγάσης.**

### **β) Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *E. coli***

Έπειτα από την αντίδραση της λιγάσης ακολουθεί η διαδικασία του μετασχηματισμού δεκτικών κυττάρων *E.coli*. Σε erppendorf του 1.5 ml αναμιγνύονται 100  $\mu$ L TOP 10 *E.coli* με 5  $\mu$ L προϊόν της αντίδρασης της λιγάσης. Η ανάμιξη γίνεται με μεγάλη προσοχή και με ελικοειδής κινήσεις προς αποφυγήν “τραυματισμού” των κυττάρων. Έπειτα γίνεται επώαση σε παγόλουτρο για 30 λεπτά και αμέσως μετά γίνεται θερμικό σοκ στους 42 °C για 1:30 λεπτά αυστηρά. Τέλος προστίθεται 200  $\mu$ L αποστειρωμένου διαλύματος LB για να επωαστούν στους 37°C για μια ώρα. Το θερμικό σοκ και η τελική επώαση γίνονται σε θερμαινόμενο αναδευτήρα ρυθμισμένο χωρίς στροφές.

Σε τρυβλία με θρεπτικό LB και αντιβιοτικό καναμυκίνη επιστρώνεται το προϊόν της διαδικασίας του μετασχηματισμού με γυάλινη ράβδο. Τα τρυβλία τοποθετούνται στους 37°C για 18 ώρες.



**Εικόνα 14: Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων.**

### **γ) Επιλογή αποικιών**

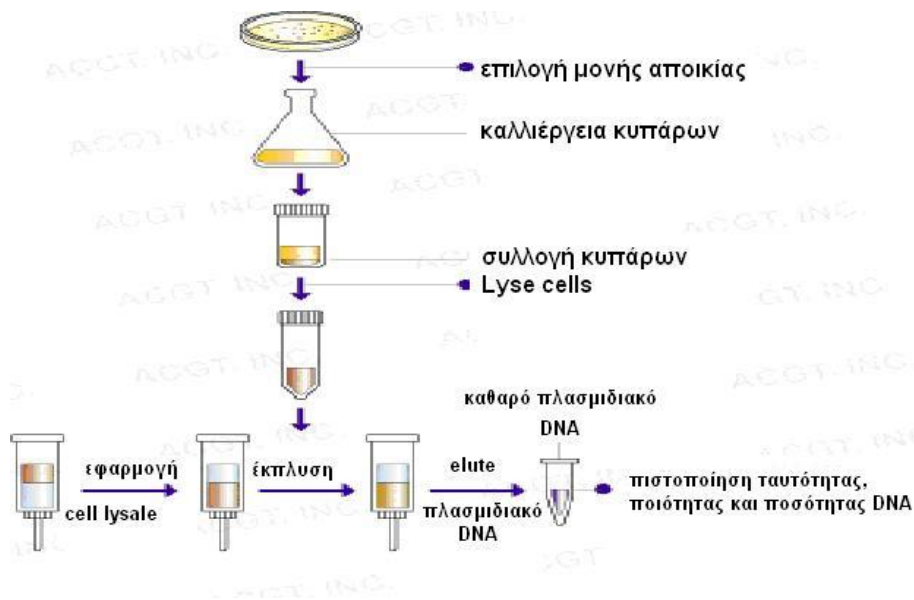
Εφόσον έχουν αναπτυχθεί οι αποικίες στα τρυβλία επιλέγονται κάποιες από αυτές και μεταφέρονται σε σωλήνες τύπου sterillin με 5 mL LB-καναμυκίνη και τοποθετούνται σε περιστρεφόμενο αναδευτήρα στις 200 στροφές και στους 37 °C ολονυκτίως.

Την επόμενη μέρα τα sterilin φυγοκεντρούνται για 10 λεπτά. Έπειτα ακολουθείται το πρωτόκολλο του Gene JET Plasmid Miniprep Kit της εταιρείας Fermentas, τα βήματα της οποίας ακολουθούν παρακάτω.

- Στα κύτταρα που βρίσκονται στα sterilin προστίθενται 250  $\mu$ L Resuspension Solution. Με την βοήθεια της πιπέτας αναμιγνύονται τα κύτταρα με το διάλυμα έως ότου “ξεκολλήσουν” από το σωλήνα. Μεταφέρετε το διάλυμα σε σωλήνα τύπου eppendorf των 1.5 ml.
- Προστίθενται 250  $\mu$ L Lysis Solution και ανακατεύουμε με το χέρι 5 με 6 φορές.



- Προστίθενται 350  $\mu\text{L}$  Neutralization Solution και ανακατεύουμε με το χέρι 5 με 6 φορές.
- Γίνεται φυγοκέντρηση 3 φορές στα 2.5 λεπτά, δηλαδή συνολικά 7.5 λεπτά.
- Μεταφέρετε το υπερκείμενο προσεχτικά σε μία στήλη και ύστερα γίνεται φυγοκέντρηση μια φορά στα 2.5 λεπτά.
- Προστίθενται 500  $\mu\text{L}$  Wash Solution και γίνεται φυγοκέντρηση μια φορά στα 2.5 λεπτά. Αυτό το στάδιο επαναλαμβάνεται μια φορά και ξαναγίνεται φυγοκέντρηση στα 2.5 λεπτά.
- Τοποθετείται η στήλη του kit σε καινούριο erpendorf των 1.5 ml και προστίθενται 50  $\mu\text{L}$  Elution Buffer.
- Γίνεται επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά και έπειτα φυγοκέντρηση δυο φορές στα 2.5 λεπτά, δηλαδή 5 λεπτά.



**Εικόνα 15: Διαδικασία απομόνωσης καθαρού πλάσμιδιακού DNA.**

## **δ) Πέψη**

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες, οι οποίες απομονώνονται από φυσικές πηγές (βακτήρια), αναγνωρίζουν μικρές αλληλουχίες DNA και κόβουν το δίκλωνο DNA σε συγκεκριμένες θέσεις, εντός της αλληλουχίας αναγνώρισης ή σε γειτονικό της σημείο. Για την αποτελεσματική δράση των ενζύμων, απαιτούνται καθαρά διαλύματα DNA.

Για το διάλυμα της πέψης αναμίχτηκαν σε erppendorf 15  $\mu$ L μετασχηματισμένο PCR-Blunt/foxx-09638 , 3  $\mu$ L ρυθμιστικό διάλυμα 10x, 8  $\mu$ L απιονισμένο νερό, 1  $\mu$ L ένζυμο Xba I και 1  $\mu$ L ένζυμο Cla I. Μετά από μια ώρα προστέθηκαν από 1  $\mu$ L των ενζύμων. Έτσι ο τελικός όγκος είναι 30  $\mu$ L. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε για 2 με 3 ώρες στους 37°C.

Ο έλεγχος των αντιδράσεων πέψης έγινε με ηλεκτροφόρηση δείγματος από το διάλυμα της αντίδρασης σε πήκτωμα αγαρόζης.

Μετά από την διαδικασία της πέψης στάλθηκε η αντίδραση για ανάλυση της αλληλουχίας και επιβεβαιώθηκε ότι υπάρχει εσώνιο. Για την απομάκρυνση του εσωνίου η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται στην επόμενη παράγραφο.

### **2.3.1.5. Απομάκρυνση εσωνίου**

Για την απομάκρυνση του εσωνίου που περιέχεται εντός του γονιδίου, πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR χρησιμοποιώντας του εκκινητές 09638SPF και 09638SPR οι οποίοι θα πλευρίσουν την περιοχή του εσωνίου και είναι επιπλέον φωσφωρυλιωμένοι στα 5'- άκρα τους για να προσδεθούν αυτόματα με την αντίδραση της λιγάσης (self-ligation) των προϊόντων της αντίδρασης PCR. Για την ενίσχυση (amplification) της αντίδρασης PCR χρησιμοποιήθηκε μια υψηλής πιστότητας DNA πολυμεράση , η Pfu-turbo, η οποία παράγει αμβλέα άκρα.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

Πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR στο πλασμίδιο pCR® Blunt που περιέχει το γονίδιο με το εσώνιο. Οι συνθήκες, στις οποίες διεξήχθη, περιελάμβαναν 30

κύκλους με στάδια αποδιάταξης (95°C για 1 min), υβριδοποίησης εκκινητών (55°C για 1 min) και πολυμερισμού (68°C για 5 min), καταλήγοντας σε περαιτέρω επιμήκυνση 15 min στους 68°C. Το γραμμικό και πλέον ενισχυμένο PCR προϊόν αυτο-προσδέθηκε με T4 DNA λιγάση (Fermentas, ΗΠΑ) και ακολούθησε μετασχηματισμός του πλασμιδίου σε κατάλληλους ξενιστές.

#### **2.3.1.6. Μεταφορά στο πλασμίδιο pPICZαC της Invitrogen**

##### **α) Αντίδραση λιγάσης στο pPICZαC**

Η διαδικασία είναι η ίδια με της παραγράφου 2.3.1.4.α μόνο που έχουμε τέσσερις αντιδράσεις οι δυο εκ των οποίων είναι control αντιδράσεις και οι άλλες δυο με αναλογίες 1:3 και 1:7. Παρακάτω παρατίθεται πίνακας με την κάθε αντίδραση.

	<b>1:3</b>	<b>1:7</b>	<b>Control 1</b>	<b>Control 2</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	13 µL	9 µL	16 µL	17 µL
<b>Ρυθμ. δ/μα</b>	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL
<b>pPICZα C</b>	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL
<b>Ένθετο DNA</b>	3 µL	7 µL	-	-
<b>Λιγάση</b>	1 µL	1 µL	1 µL	-

Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στους 16°C για 3 με 4 ώρες.

##### **β) Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *E.coli***

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η ίδια σύμφωνα με την παράγραφο 2.3.1.4.β μόνο που το προϊόν της αντίδρασης της λιγάσης αναμίχθηκε σε δεκτικά κύτταρα *E.coli* TOP 10 F' και χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό LSLB.

### **γ) Επιλογή αποικιών**

Ακολουθείτε η ίδια διαδικασία σύμφωνα με την παράγραφο 2.3.1.4.γ και εφαρμόζεται το πρωτόκολλο του Gene JET Plasmid Miniprep Kit. Για θρεπτικό χρησιμοποιήθηκε LSLB.

### **δ) Πέψη**

Επαναλαμβάνεται το στάδιο της παραγράφου 2.3.1.4.δ.

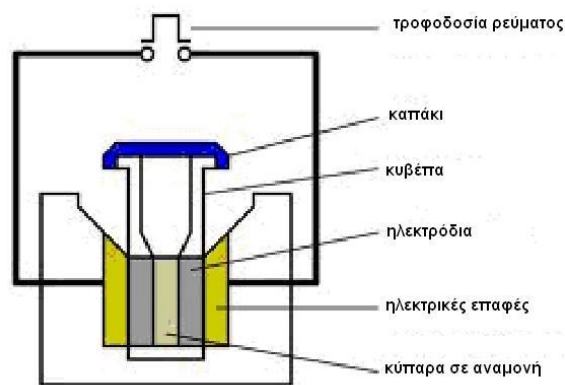
### **2.3.2. Υπερέκφραση του γονιδίου**

Για την υπερέκφραση του γονιδίου αρχικά γραμμικοποιείται το pPICZαC με το ένζυμο περιορισμού Sac I. Το διάλυμα περιείχε 10 μL ρυθμιστικού διαλύματος, 7 μL περιοριστικό ένζυμο Sac I, 30 μL pPICZαC και 53 μL υπερκάθαρου στείρου νερού. Ο συνολικός όγκος ήταν 100 μL .

Έπειτα ακολουθεί η διαδικασία του ηλεκτρομετασχηματισμού (electroporation). Η έννοια του ηλεκτρομετασχηματισμού εκμεταλλεύεται τη σχετικά αδύναμη φύση των αλληλεπιδράσεων των υδρόφοβων/υδρόφιλων φωσφολιπιδίων της διπλοστοιβάδας και στην δυνατότητα που έχει να επανασυναρμολογηθεί αυθόρμητα μετά την διαταραχή της. Έτσι, ένα γρήγορο σοκ τάσης ενδέχεται να διακόψει περιοχές της μεμβράνης προσωρινά, επιτρέποντας πολικά μόρια να περάσουν, όπου στη συνέχεια η μεμβράνη μπορεί να σφραγίσει και πάλι γρήγορα και το κύτταρο να μείνει άθικτο.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για το μετασχηματισμό των κυττάρων της ζύμης περιγράφεται στο εγχειρίδιο «EasySelect Pichia Expression kit, Invitrogen, Η.Π.Α».

Η τάση η οποία εφαρμόστηκε ήταν 2 kV και η ηλεκτροδιέγερση διήρκεσε μόλις 4.1 ms.



**Εικόνα 16: Συσκευή ηλεκτρομετασχηματισμού.**

Τέλος τα μετασχηματισμένα κύτταρα επώαστηκαν στους 30 °C για 2 με 3 μέρες, σε τρυβλία που περιείχαν θρεπτικό διάλυμα YPDS και αντιβιοτικό ζεοσίνη.

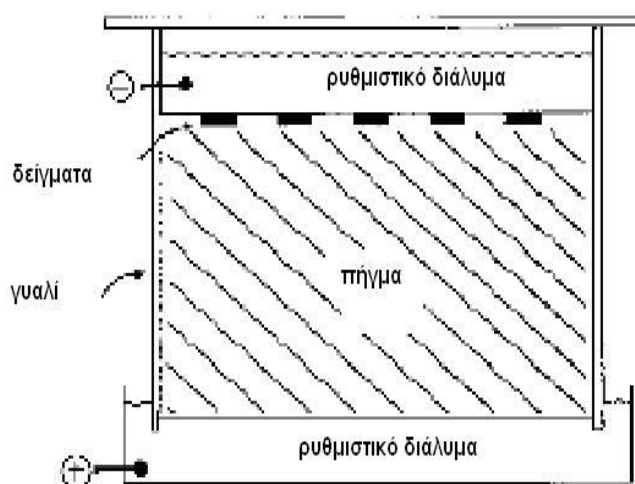
Η έκφραση του γονιδίου έγινε σε καλλιέργειες μικρής κλίμακας χρησιμοποιώντας σαν θρεπτικά μέσα τα BMGY και BMMY σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας. Από τις καλλιέργειες γινόταν δειγματοληψία κάθε μέρα επί 9 μέρες και έτσι παρατηρήθηκε η παραγωγή ενός μορίου 25 kDa.

Η μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας έγινε με τη χρήση της μεθόδου προσδιορισμού αναγωγικών σακχάρων του δινιτροσαλυκυλικού οξέος (DNS, Miller 1959). Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε birchwood xylan. Έπειτα από την δειγματοληψία γινόταν φυγοκέντρηση στα 2.5 λεπτά και από το υπερκείμενο λαμβάνονταν 125  $\mu$ L όπου αναμιγνύονταν με 125  $\mu$ L ξυλάνης. Επώαζονταν σε θερμοκρασία 50 °C σε υδατόλουτρο για 10 με 15 λεπτά και έπειτα αφού τοποθετηθούν σε πάγο προστίθενται 250  $\mu$ L διαλύματος DNS. Στη συνέχεια τα δείγματα βράζονταν για 5 λεπτά και μετά γινόταν προσθήκη 2 ml νερού. Τα δείγματα φωτομετρούνταν στα 540 nm σε φωτόμετρο. Η καμπύλη αναφοράς προσδιορίζονταν με την προσθήκη διαλυμάτων ξυλόζης γνωστής συγκέντρωσης σε διάλυμα DNS, βρασμό 10 min και μέτρηση της απορρόφησης στα 540 nm.

### 2.3.2.1 Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE

Η ηλεκτροφόρηση αποτελεί μια μέθοδο διαχωρισμού και ταυτοποίησης βιομορίων μεγάλου μοριακού βάρους όπως οι πρωτεΐνες. Η μέθοδος βασίζεται στην μετακίνηση φορτισμένων μακρομορίων υπό την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου. Ο βαθμός μετακίνησης των μορίων εξαρτάται από την ένταση του πεδίου καθώς και από το καθαρό φορτίο, το μέγεθος και το σχήμα του μορίου.

Οι πρωτεΐνες είναι αμφοτερικές ενώσεις και το φορτίο τους εξαρτάται από το pH του διαλύματος στο οποίο βρίσκονται. Όταν το καθαρό φορτίο μιας πρωτεΐνης είναι μηδενικό τότε η αντίστοιχη τιμή του pH καλείται ισοηλεκτρικό σημείο. Για τιμές pH πάνω από το ισοηλεκτρικό σημείο το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης είναι αρνητικό και η πρωτεΐνη μεταφέρεται προς την άνοδο (θετικός πόλος) ενός ηλεκτρικού πεδίου. Αντίστοιχα για τιμές pH κάτω από το ισοηλεκτρικό σημείο η πρωτεΐνη είναι θετικά φορτισμένη και μετακινείται προς την κάθοδο (αρνητικός πόλος). Επίσης το φορτίο που θα έχει μια πρωτεΐνη εξαρτάται από το μέγεθος της.



**Εικόνα 17: Διάταξη ηλεκτροφόρησης Page.**

Η ηλεκτροφόρηση PAGE (PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) είναι μια μέθοδος ηλεκτροφόρησης ζώνης στην οποία ως ακίνητη φάση χρησιμοποιείται ένα πορώδες πήγμα (gel) που δημιουργείται από την αντίδραση πολυμερισμού δύο μονομερών, του ακριλαμιδίου και της ένωσης N,N-methylene-bis-acrylamide που χρησιμοποιείται για την δημιουργία πλέγματος παρουσία καταλύτη (TEMED).

Αρχικά το δείγμα που περιέχει τις πρωτεΐνες τοποθετείται σε περιοχή όπου η συγκέντρωση του πηγματος είναι 4,5% . Η τιμή του pH του ρυθμιστικού διαλύματος (Buffer) είναι πάνω από το ισοηλεκτρικό σημείο των πρωτεϊνών ώστε όλες οι πρωτεΐνες να έχουν αρνητικό καθαρό φορτίο. Υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου κατάλληλης έντασης οι φορτισμένες πρωτεΐνες τείνουν να μετακινηθούν προς την άνοδο. Κατά την μεταφορά τους εισέρχονται σε περιοχή όπου η συγκέντρωση του πηγματος είναι 12% και η αντίσταση στην κίνηση τους είναι ισχυρή λόγω του πυκνότερου πλέγματος. Έτσι όσο μεγαλύτερο φορτίο και όσο μικρότερο μέγεθος έχει η πρωτεΐνη, τόσο μεγαλύτερη θα είναι η ταχύτητα κίνησής της προς την άνοδο. Με αυτό τον τρόπο γίνεται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών.

Στην συνέχεια με την κατάλληλη επεξεργασία της επιφάνειας του πηγματος με τον παράγοντα Coomassie Brilliant Blue εμφανίζεται η κατανομή των πρωτεϊνών (bands) πάνω στο πήγμα. Η ταυτοποίηση των πρωτεϊνών γίνεται με βάση την θέση της πάνω στην επιφάνεια του πηγματος.

Η προετοιμασία του δείγματος για να εισαχθεί στο gel της ηλεκτροφόρησης γίνεται ως εξής: 15μL δείγματος λαμβάνονται και τοποθετούνται σε erppendorf, στο οποίο προστίθεται ακόμα 7μL ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης. Στη συνέχεια το erppendorf αφήνεται για 5min σε νερό που βράζει. Τέλος, ποσότητα 18μL από το παραπάνω erppendorf, εισάγεται στα «τσεπάκια» (χώρος εισαγωγής τους δείγματος) του πηκτώματος της αγαρόζης της ηλεκτροφόρησης και ξεκινάει η ηλεκτροφόρηση, με τη σωστή σύνδεση της διάταξης με το ρεύμα.

## **Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup> : Αποτελέσματα**

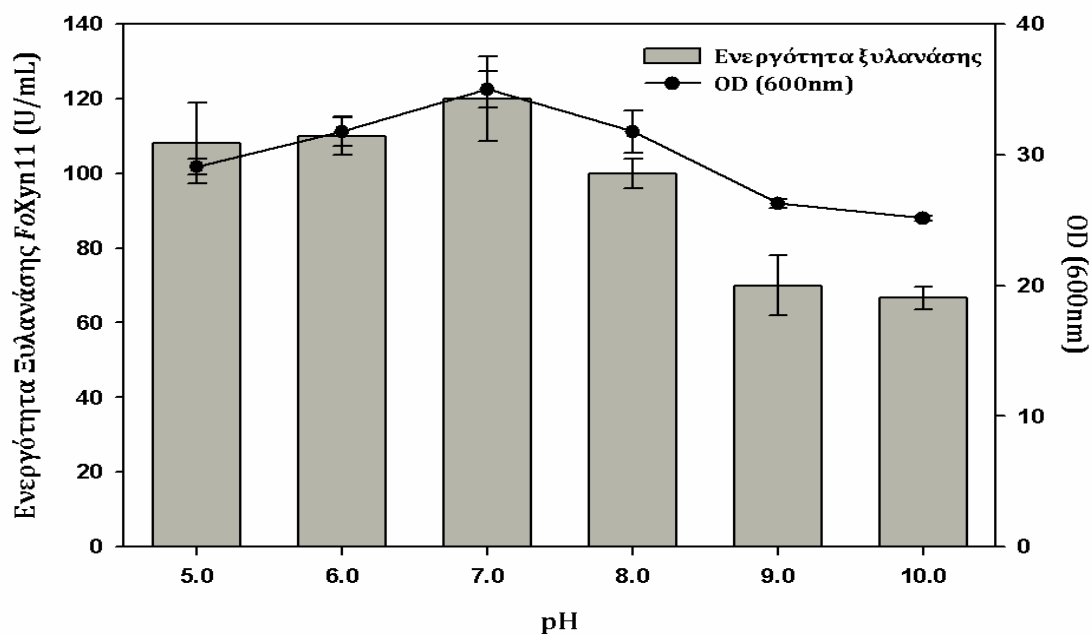
### **3.1. Βελτιστοποίηση της παραγωγής της ενδο-1,4-β-ξυλανάσης FoXyn11-09638 από το ζυμομύκητα *P. pastoris***

Στην παρούσα εργασία προκειμένου να αυξηθεί η παραγωγή της ξυλανάσης FoXyn11 από τη ζύμη *P. Pastoris*, βελτιστοποιήθηκαν οι συνθήκες της ζύμωσης, όπου κάθε φορά μια συνθήκη της καλλιέργειας μεταβαλλόταν (αρχικό pH θρεπτικού μέσου, ταχύτητα ανάδευσης, συγκέντρωση μεθανόλης, σχήμα κωνικών φιαλών), ενώ οι υπόλοιπες διατηρούνταν σταθερές. Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν στους 30°C με θρεπτικό μέσο BMMY, σε απλές γυάλινες κωνικές φιάλες *Erlenmeyer* όγκου 250 mL και σε δεύτερη φάση σε ειδικά σχεδιασμένες φιάλες με εσωτερικά πτερύγια (τύπου *baffled*). Ο χρόνος επώασης ήταν 216 h, ενώ καθημερινά προστίθεντο μεθανόλη.

#### **3.1.1. Πείραμα 1<sup>ο</sup> : Ρυθμιστικά διαλύματα με διαφορετικό pH (5 - 10)**

Μελετήθηκε η επίδραση του αρχικού pH του θρεπτικού μέσου στην ενζυμική παραγωγή, υπό σταθερή ανάδευση (200 rpm) και παροχή 0,5% (v/v) μεθανόλης. Η μέγιστη ενεργότητα ξυλανάσης, παρατηρήθηκε σε pH 7,0 (120 U/mL), ενώ σε αλκαλικό περιβάλλον η απόδοση της ξυλανάσης σχεδόν υποδιπλασιάστηκε. Ομοίως, η οπτική πυκνότητα των κυττάρων εμφάνισε τη μέγιστη τιμή της σε τιμή αρχικού pH 7,0 και την κατώτερη σε pH 10,0.

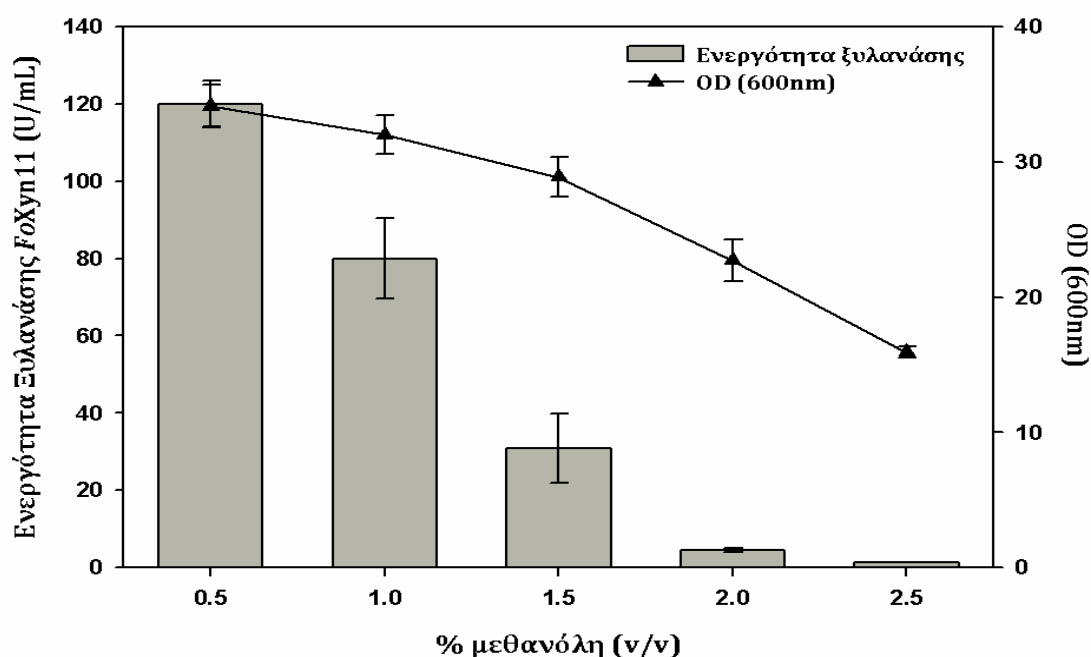




**Διάγραμμα 1<sup>ο</sup>:** Επίδραση του αρχικού pH του θρεπτικού μέσου (μετά το πέρας 216h) στην ενζυμική ενεργότητα της ξυλανάσης *FoXyn11* και στην κυτταρική αύξηση της ζύμης *P.pastoris*.

### 3.1.2. Πείραμα 2<sup>ο</sup> : Διαφορετικές συγκεντρώσεις μεθανόλης (0.50 – 3.00 %)

Διατηρώντας την ταχύτητα ανάδευσης στις 200 rpm και το pH του μέσου BMMY στο 7,0 μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης της μεθανόλης στην έκφραση του γονιδίου. Κάθε 24 h προστίθεντο σε πέντε ζεύγη καλλιεργειών 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 και 2,5% (v/v) μεθανόλη, αντίστοιχα. Στη συγκέντρωση 0.5% παρατηρήθηκαν τα υψηλότερα επίπεδα ξυλανάσης (120 U/mL), ενώ αντιθέτως στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις μεθανόλης τα επίπεδα αυτά μειώθηκαν σημαντικά. Παρόμοια συμπεριφορά έδειξε και ο πληθυσμός των κυττάρων, όπου στις υψηλές συγκεντρώσεις μεθανόλης περιορίστηκε αισθητά, σύμφωνα με μετρήσεις της οπτικής πυκνότητας σε μήκος κύματος 600nm (διάγραμμα 2<sup>ο</sup>).

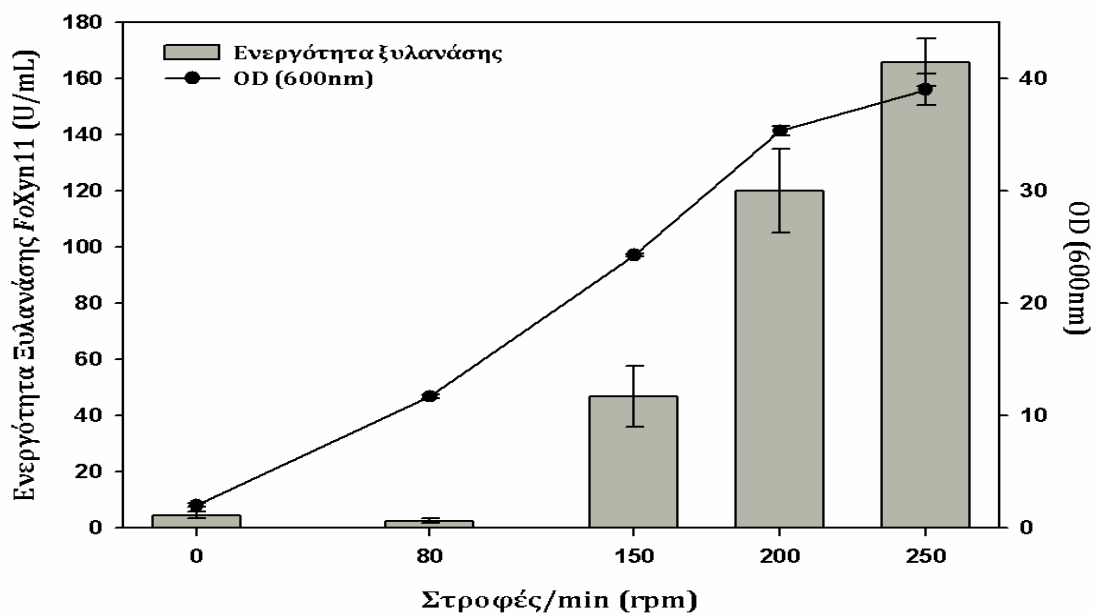


**Διάγραμμα 2<sup>ο</sup>:** Επίδραση της % (v/v) συγκέντρωσης μεθανόλης (μετά το πέρας 216h) στην ενζυμική ενεργότητα της ξυλανάσης *FoXyn11* και στην κυτταρική αύξηση της ζύμης *P.pastoris*.

### 3.1.3. Πείραμα 3<sup>ο</sup> : Διαφορετικός ρυθμός ανάδευσης (0 – 250 rpm)

Ο επαρκής αερισμός είναι απαραίτητος για τα κύτταρα με φαινότυπο *Mut<sup>+</sup>*, καθώς εξασφαλίζει το καταβολισμό της μεθανόλης σε φορμαλδεΰδη. Σε τρίτο στάδιο έγιναν δοκιμές μεταβάλλοντας την ταχύτητα ανάδευσης από 0 έως 250 rpm, σε αρχικό pH 7.0, προσθέτοντας 0,5% (v/v) μεθανόλη. Η μέγιστη ενεργότητα ξυλανάσης μετρήθηκε στις 250 rpm (166 U/mL) ενώ απουσία ανάδευσης σημειώθηκε ελάχιστη έκφραση του *foxg\_09638.2* (διάγραμμα 3<sup>ο</sup>).

Στο ίδιο πρότυπο διαμορφώθηκε και η καμπύλη κυτταρικής αύξησης μετά από μετά από 216h επώασης, κατά την οποία ελάχιστη ανάπτυξη παρατηρήθηκε σε ταχύτητα ανάδευσης 80 rpm, ενώ στη μέγιστη ταχύτητα η τιμή αυτή τριπλασιάστηκε (διάγραμμα 3<sup>ο</sup>).

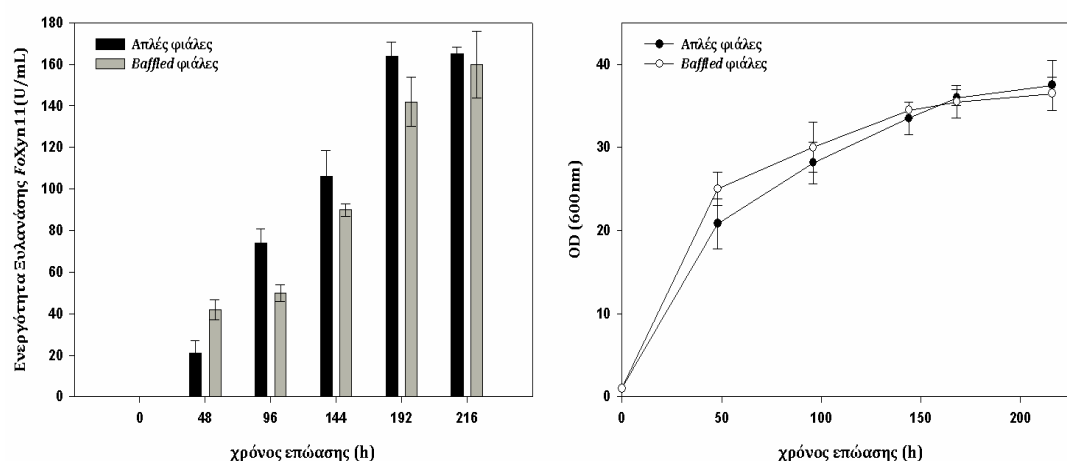


**Διάγραμμα 3<sup>ο</sup>:** Επίδραση της ταχύτητας ανάδευσης (μετά το πέρας 216h) στην ενζυμική ενεργότητα της ξυλανάσης FoXyn11 και στην κυτταρική αύξηση της ζύμης *P.pastoris*.

#### 3.1.4. Πείραμα 4<sup>ο</sup> : Κωνικές φιάλες με διαφορετικές εκγοπές (καμία, 2, 4 και 6)

Τέλος, με όλες τις υπό μελέτη συνθήκες να διατηρούνται σταθερές στις τιμές στις οποίες καταγράφηκε η βέλτιστη παραγωγή ενζύμου (pH 7,0, 250 rpm, 0,5% μεθανόλη), πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες σε απλές φιάλες και σε φιάλες τύπου *baffled* (250 mL). Τα εσωτερικά πτερύγια που υπάρχουν στις τελευταίες αυξάνουν το διαλυμένο οξυγόνο που μεταφέρεται στην καλλιέργεια και κατ' επέκταση οδηγούν σε μεγαλύτερη κυτταρική αύξηση κυρίως σε καλλιέργειες βακτηρίων και ζυμομυκήτων. Πράγματι, στην περίπτωση της παραγωγή ξυλανάσης, τις πρώτες 48 h σημειώθηκε αύξηση της ενεργότητας στις φιάλες *baffled* κατά 100%. Η ογκομετρική παραγωγικότητα στις τέσσερις πρώτες ημέρες της καλλιέργειας υπολογίστηκε στα 771 U/L/h, ενώ σταδιακά αυξήθηκε και παρέμεινε στα 764 U/L/h μετά από 216 h επώασης. Ομοίως στις απλές φιάλες *Erlenmeyer* η ογκομετρική παραγωγικότητα κυμάνθηκε μεταξύ 521 U/L/h στις πρώτες τέσσερις ημέρες και 741

U/L/h την ένατη και τελευταία ημέρα της καλλιέργειας τιμή που βρίσκεται στα ίδια επίπεδα με την αντίστοιχη μέτρηση στις φιάλες τύπου *baffled* (166 U/mL και 160 U/mL, αντίστοιχα). Στην περίπτωση της κυτταρικής συγκέντρωσης, η αύξηση της βιομάζας κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα τόσο για τις άλλες όσο και τις φιάλες τύπου *baffled* (διάγραμμα 4<sup>ο</sup>).



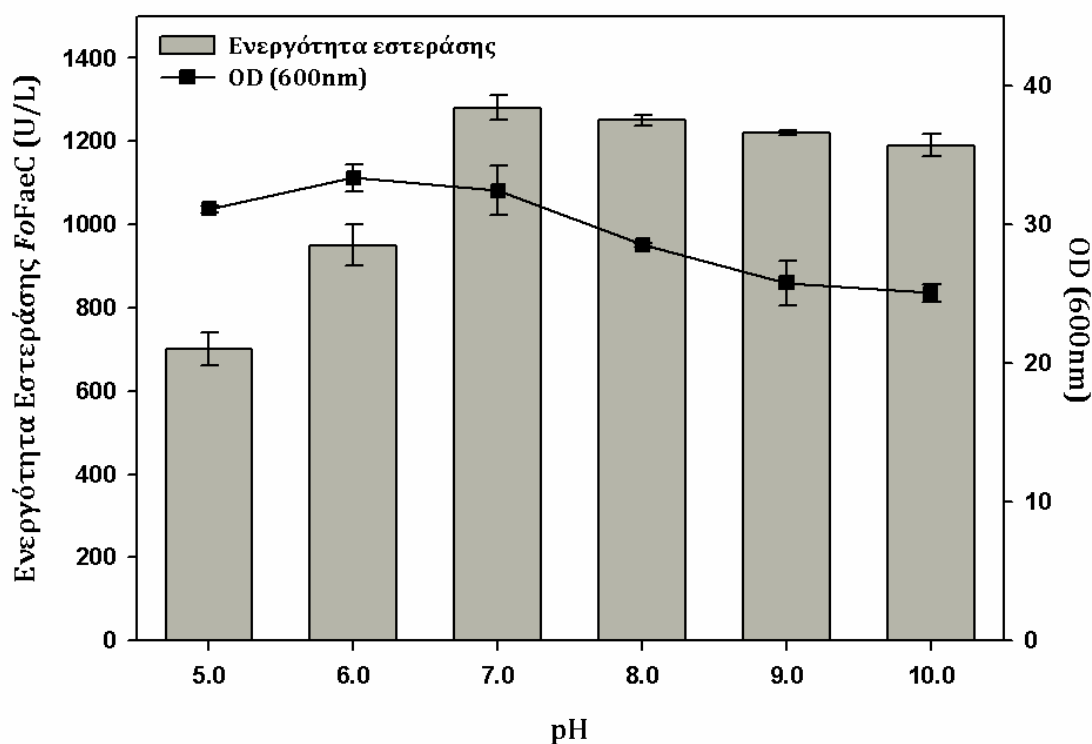
**Διάγραμμα 4<sup>ο</sup>:** Επίδραση του σχήματος των κωνικών φιαλών στην ενζυμική ενεργότητα της FoXyn11 και στην κυτταρική ανάπτυξη της ζύμης *P.pastoris* συναρτήσει του χρόνου.

### 3.2. Βελτιστοποίηση της παραγωγής της εστεράσης του φερουλικού οξέος FoFaeC-12213 από το ζυμομύκητα *P. Pastoris*

Η ενίσχυση της παραγωγής της εστεράσης του φερουλικού οξέος FoFaeC-12213 από το ζυμομύκητα *P. Pastoris* πραγματοποιήθηκε, όπως και στην περίπτωση της ξυλανάσης FoXyn11, με την βελτιστοποίηση των συνθηκών της ζύμωσης του μικροοργανισμού. Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 30°C, παρουσία θρεπτικού μέσου BMMY, σε γυάλινες κωνικές φιάλες *Erlenmeyer* όγκου 250 mL απλές και ειδικά σχεδιασμένες ώστε να φέρουν εσωτερικά πτερύγια (τύπου *baffled*). Ο χρόνος επώασης ήταν 216 h , ενώ καθημερινά χορηγούνταν μεθανόλη.

### 3.2.1. Πείραμα 1<sup>ο</sup> : Ρυθμιστικά διαλύματα με διαφορετικό pH (5 - 10)

Στο πρώτο στάδιο μελετήθηκε η επίδραση του αρχικού pH του θρεπτικού μέσου στην ενζυμική παραγωγή, με σταθερή ανάδευση (200 rpm) και παροχή 0.5% (v/v) μεθανόλης. Το εύρος τιμών pH που χρησιμοποιήθηκε ήταν από 5,0 έως και 10,0. Η μεγαλύτερη ενεργότητα εστεράσης, παρατηρήθηκε σε pH 7,0 (1280 U/L), ενώ ακόμη και αλκαλικό περιβάλλον η απόδοση της εστεράσης παρέμεινε σε σταθερά επίπεδα. Αντιθέτως, η οπτική πυκνότητα των κυττάρων εμφάνισε τη μέγιστη τιμή της σε τιμή αρχικού pH 6,0 και την κατώτερη σε τιμή pH 10,0 (διάγραμμα 5<sup>ο</sup>)

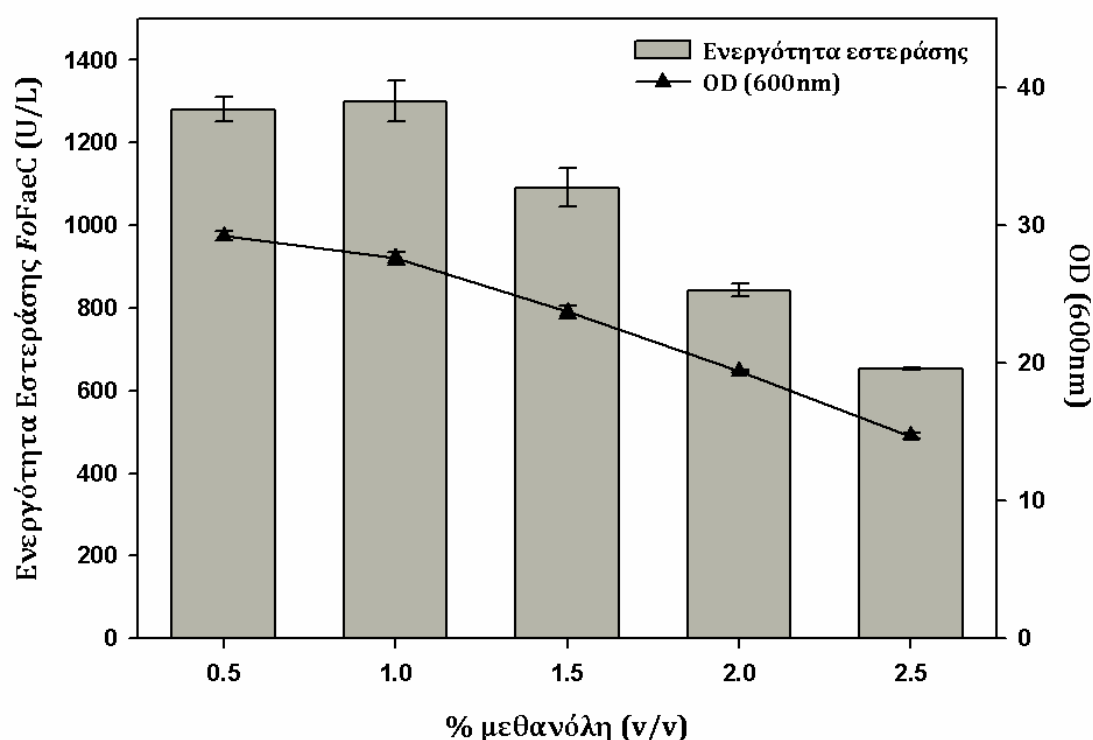


[Διάγραμμα 5<sup>ο</sup>](#): Επίδραση του αρχικού pH του θρεπτικού μέσου (μετά το πέρας 216 h στην ενζυμική ενεργότητα της FoFaeC και στην κυτταρική ανάπτυξη της ζύμης *P.pastoris* )

### 3.2.2. Πείραμα 2<sup>ο</sup> : Διαφορετικές συγκεντρώσεις μεθανόλης (0.5 – 2.5 %)

Διατηρώντας την ταχύτητα ανάδευσης στις 200 rpm και το αρχικό pH του μέσου BMMY στην τιμή 7,0, μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης της μεθανόλης

στην παραγωγή της εστεράσης. Κάθε 24 h προστίθεντο 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 και 2,5% (v/v) μεθανόλης σε πέντε ζεύγη καλλιεργειών, αντίστοιχα. Στη συγκέντρωση 1,0% παρατηρήθηκαν υψηλά επίπεδα ενεργότητας εστεράσης (1300 U/L), ενώ στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις παρατηρήθηκε μείωση (διάγραμμα 6<sup>ο</sup>). παρόμοια συμπεριφορά έδειξε και ο πληθυσμός των κυττάρων, όπου στις υψηλές συγκεντρώσεις μεθανόλης περιορίστηκε αισθητά. Σύμφωνα με μετρήσεις της οπτικής πυκνότητας σε μήκος κύματος 600nm.

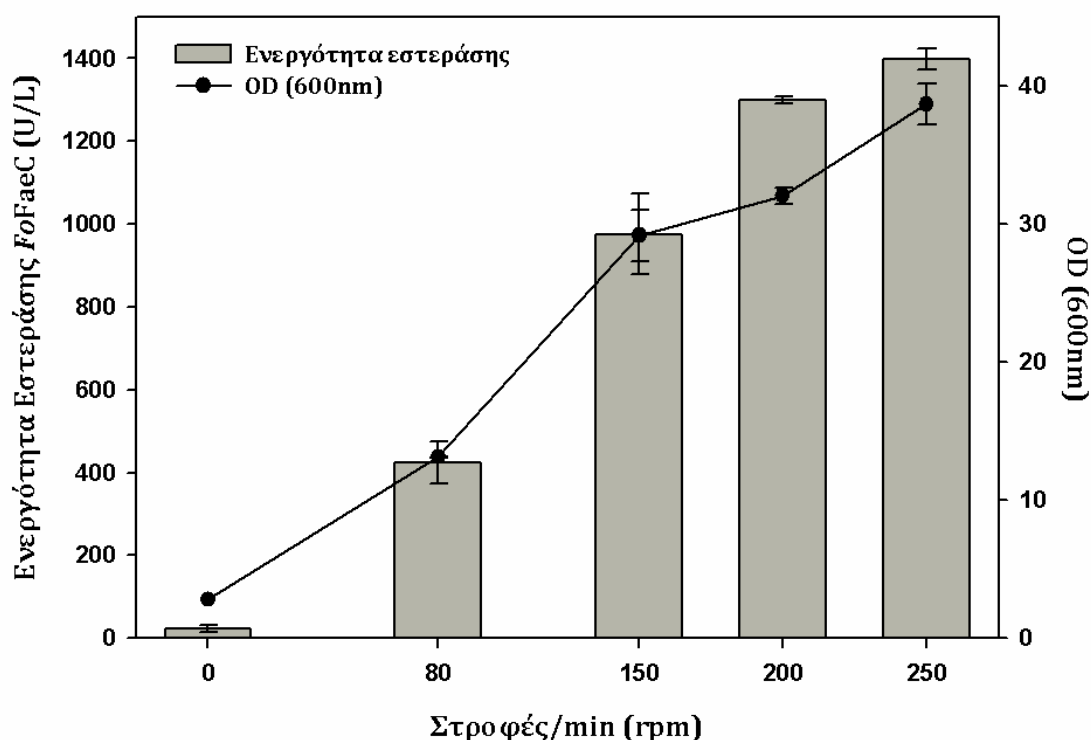


**Διάγραμμα 6<sup>ο</sup>:** Επίδραση της % (v/v) συγκέντρωσης μεθανόλης (μετά το πέρας 216 h στην ενζυμική ενεργότητα της FoFaeC και στην κυτταρική ανάπτυξη της ζύμης *P.pastoris*)

### 3.2.3. Πείραμα 3<sup>ο</sup> : Διαφορετικός ρυθμός ανάδευσης (0 – 250 rpm)

Σε τρίτο στάδιο έγιναν δοκιμές μεταβάλλοντας την ταχύτητα ανάδευσης από 0 έως και 250 rpm, με αρχικό pH 7,0, προσθέτοντας μεθανόλη 1,0 % (v/v). Η μέγιστη ενεργότητα εστεράσης μετρήθηκε στις 250 rpm (1399 U/L), ενώ απουσία ανάδευσης σημειώθηκε μηδαμινή έκφραση του *foxg\_12213.2* (διάγραμμα 7<sup>ο</sup>).

Αντίστοιχο αποτέλεσμα παρατηρήθηκε και στην καμπύλη κυτταρικής αύξησης μετά από 216 h επώασης, όπου ελάχιστη ανάπτυξη παρατηρήθηκε σε ταχύτητα ανάδευσης 80 rpm, ενώ στη μέγιστη ταχύτητα η τιμή αυτή τριπλασιάστηκε.



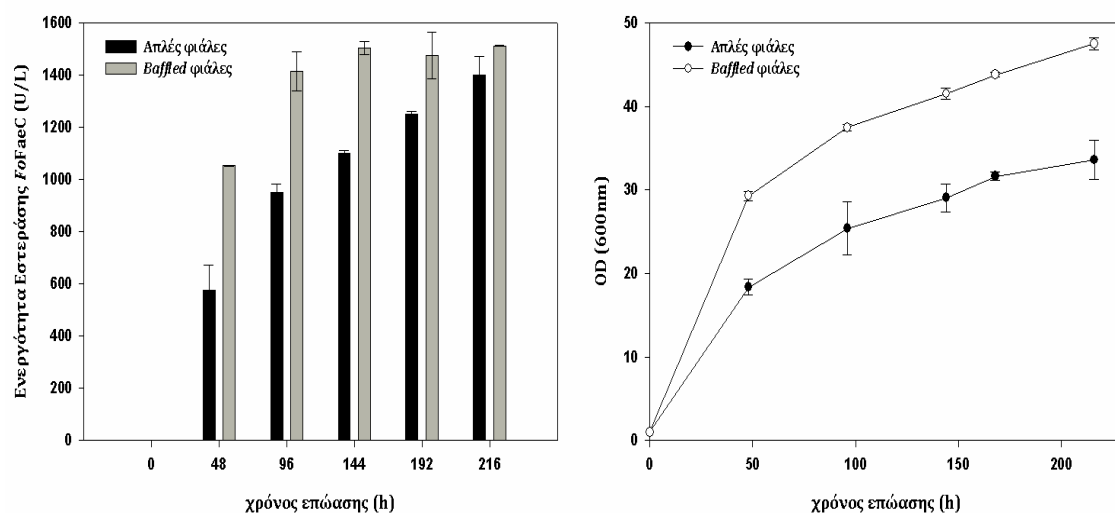
**Διάγραμμα 7<sup>ο</sup>:** Επίδραση της ταχύτητας ανάδευσης (μετά το πέρας 216 h) στην ενζυμική ενεργότητα της FoFaeC και στην κυτταρική ανάπτυξη της ζύμης *P.pastoris*.

#### 3.2.4. Πείραμα 4<sup>ο</sup> : Κωνικές φιάλες με διαφορετικές εκγοπές (καμία, 2, 4 και 6)

Τέλος, με όλους τους υπό μελέτη παράγοντες να παραμένουν στις βέλτιστες τους τιμές (pH 7,0, 250 rpm, 1,0% μεθανόλη), πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες σε απλές φιάλες και σε φιάλες τύπου *baffled* (250 mL). Τα εσωτερικά πτερύγια που υπάρχουν στις τελευταίες, παρέχουν καλύτερο αερισμό στην καλλιέργεια και κατ' επέκταση μεγαλύτερη αύξηση του μικροοργανισμού, κυρίως όταν πρόκειται για βακτηριακά στελέχη και στελέχη ζύμης. Πράγματι, ενεργότητα της εστεράσης στις φιάλες *baffled* σημείωσε αύξηση κατά 83 % τις πρώτες 48h, σε σύγκριση με τις απλές φιάλες, ενώ η μέγιστη τιμή καταμετρήθηκε μετά το πέρας εννέα ημερών (1511 U/L).

Αντίστοιχα, στις απλές φιάλες η ενεργότητα ακολούθησε σταθερή αύξηση συναρτήσει του χρόνου επώασης, με τη μέγιστη τιμή να μετράται μετά από 216 h (1399 U/L) (διάγραμμα 8°)

Η ογκομετρική παραγωγικότητα στις δύο πρώτες ημέρες της καλλιέργειας υπολογίστηκε στα 22 U/L/h, ενώ σταδιακά μειώθηκε και παρέμεινε στα 7 U/L/h μετά από 192 h επώασης. Ομοίως, στις απλές φιάλες Erlenmeyer η ογκομετρική παραγωγικότητα κυμάνθηκε μεταξύ 12 U/L/h στις δυο πρώτες ημέρες και 6,5 U/L/h στις τελευταίες ημέρες της καλλιέργειας, τιμή που βρίσκεται στα ίδια επίπεδα με την αντίστοιχη μέτρηση στις φιάλες τύπου *baffled*. Αύξηση σημειώθηκε και στην περίπτωση της κυτταρικής συγκέντρωσης, η οποία στις φιάλες τύπου *baffled* μετρήθηκε κατά 40% υψηλότερη σε σύγκριση με τις απλές κωνικές φιάλες, έπειτα από 216 h επώασης.



**Διάγραμμα 8°:** Επίδραση του σχήματος των κωνικών φιαλών στην ενζυμική ενεργότητα της FoFaeC και στην κυτταρική ανάπτυξη της ζύμης *P.pastoris*, συναρτήσει του χρόνου.



## **Κεφάλαιο 4<sup>ο</sup> : Συμπεράσματα**

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε επιτυχώς η κλωνοποίηση και η ετερόλογη υπερέκφραση στο μεθυλότροφο μύκητα *P. pastoris* της ξυλανάσης από τον μικροοργανισμό *F. oxysporum* (FoXyn11-09638) έπειτα από προσθήκη μεθανόλης σε υγρές καλλιέργειες μικρής κλίμακας και η ενεργότητά της ανιχνεύθηκε με κατάλληλες δοκιμές στις καλλιέργειες αυτές χρησιμοποιώντας ξυλάνη από σημύδα ως υπόστρωμα. Το μοριακό βάρος των ενζύμων προσδιορίστηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE).

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μια προσπάθεια ενίσχυσης της παραγωγής των ενζύμων του μεσόφυλου μύκητα *F. oxysporum* μέσω βελτιστοποίησης των συνθηκών ζύμωσης της ξυλανάσης (FoXyn11-09638) και της εστεράσης φερουλικού οξέος (FoFaeC-12213), η οποία κλωνοποιήθηκε και υπερεκφράστηκε από τους Moukoulis et al, 2008. Μελετήθηκε αρχικά η ενζυμική παραγωγή σε θρεπτικό μέσο με αρχικές τιμές pH από 5,0 έως και 10,0, σε σταθερή ταχύτητα ανάδευσης (200 στροφές/min) και παροχή 0,5% (v/v) μεθανόλης. Η υψηλότερη ενεργότητα και για τα δύο ανασυνδυασμένα ένζυμα, παρατηρήθηκε σε αρχικό pH 7,0 έπειτα από 216 h (FoXyn11: 120 U/mL, FoFaeC: 1300 U/L).

Διατηρώντας την ταχύτητα ανάδευσης στις 200 στροφές/min και το pH του μέσου BMMY στο 7,0 μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης της μεθανόλης στην έκφραση των γονιδίων. Τα υψηλότερα επίπεδα ξυλανάσης και εστεράσης παρατηρήθηκαν έπειτα από προσθήκη μεθανόλης συγκέντρωσης 0,5% και 1,0% (v/v), αντίστοιχα (FoXyn11: 120 U/mL, FoFaeC: 1300 U/L).

Σε τρίτο στάδιο έγιναν δοκιμές μεταβάλλοντας την ταχύτητα ανάδευσης από 0 έως και 250 στροφές/min, σε αρχικό pH 7,0, προσθέτοντας μεθανόλη 0,5% στην περίπτωση της ξυλανάσης και 1,0% στην περίπτωση της εστεράσης. Η ανάδευση και ο αερισμός φάνηκε να επηρεάζει και τα δύο ένζυμα. Οι μέγιστες ενεργότητες μετρήθηκαν στις 250 στροφές ενώ, απουσία ανάδευσης σημειώθηκε μηδαμινή έκκριση πρωτεϊνών (FoXyn11: 166 U/mL, FoFaeC: 1399 U/L).

Με όλους τους μελετώμενους παράγοντες να παραμένουν στις βέλτιστες τους τιμές (FoXyn11: pH 7,0, 250 rpm, 0,5% μεθανόλη, FoFaeC: pH 7,0, 250 rpm, 1,0%

μεθανόλη), πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες σε απλές φιάλες και φιάλες τύπου *baffled* (250 mL). Στο στάδιο αυτό, σημειώθηκε διπλασιασμός της ενεργότητας των ενζύμων στις φιάλες τύπου *baffled* τις πρώτες 48 h επώασης, ενώ στη συνέχεια η παραγωγικότητα κυμάνθηκε στα ίδια επίπεδα τόσο στις απλές όσο και στις ειδικές φιάλες (*FoXyn11*: 740-770 U/L/h, *FoFaeC*: 6,5-7,0 U/L/h). Το γεγονός αυτό οφείλεται πιθανότατα την αύξηση των επιπέδων του οξυγόνου στις φιάλες με τα εσωτερικά πτερύγια σε σύγκριση με τις απλές φιάλες, τις πρώτες κιόλας 48 h επώασης. Ωστόσο, η καταγραφή παρόμοιων τιμών παραγωγικότητας, μετά το πέρας των δύο ημερών και για τις δύο περιπτώσεις, υποδηλώνει ότι πιθανότατα διαφορετικοί παράγοντες, όπως ο αφρισμός, επηρεάζουν την αποδοτικότητα της παραγωγής των συγκεκριμένων ενζύμων από το μεθυλότροφο ζυμομύκητα. Συγκεκριμένα, η δημιουργία φυσαλίδων αέρα μπορεί να οδηγήσει στη μείωση της απόδοσης παραγωγής του πρωτεϊνικού μορίου, καθώς η θραύση τους επηρεάζει την σταθερότητα της εκκρινόμενης πρωτεΐνης, ενώ παράλληλα παρεμποδίζεται σημαντικά η μεταφορά οξυγόνου προς την καλλιέργεια των κυττάρων (Holmes *et al.*, 2006).

Εν κατακλείδι, η διαδικασία της ενίσχυσης της παραγωγής των δύο ενζύμων του μύκητα *F. oxysporum*, μέσω κατάλληλης προσαρμογής των συνθηκών ζύμωσης, είχε ως αποτέλεσμα τη σταδιακή αύξηση της απόδοσης της έκφρασης της ξυλανάσης (*FoXyn11-09638*) από τα 110 U/mL στα 166 U/mL και της εστεράσης του φερουλικού οξέος (*FoFaeC-12213*) από τα 945 U/L στα 1511 U/L. Δηλαδή η τροποποίηση του αρχικού πρωτοκόλλου επέφερε 51% για την παραγωγή της πρώτης περίπτωσης και 60% για την παραγωγή της δεύτερης περίπτωσης, έπειτα από τέσσερα διαφορετικά στάδια βελτιστοποίησης (μεταβολή στο pH του θρεπτικού μέσου, στην ταχύτητα ανάδευσης κατά την επώαση, στο ποσοστό προστιθέμενης μεθανόλης και στον αερισμό).

## **Κεφάλαιο 5<sup>ο</sup> : Βιβλιογραφία**

Badal C. Saha 2003: Hemicellulose bioconversion

Collins T., Gerday C., Feller G. (2005). Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. FEMS Microbiology Reviews 29

Peter Biely (2003) Xylanolytic Enzymes , Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia

M. L. T. M. Polizeli , A. C. S. Rizzatti , R. Monti , H. F. Terenzi , J. A. Jorge , D. S. Amorim (2005). Xylanases from fungi: properties and industrial applications , Appl Microbiol Biotechnol

Peter Biely\* and Vladimír Puchart (2006) : Recent progress in the assays of xylanolytic enzymes, Journal of the Science of Food and Agriculture J Sci Food Agric

S. Subramaniyan, P. Prema, Critical Reviews in Biotechnology (2002), Biotechnology of Microbial Xylanases: Enzymology, Molecular Biology, and Application.

Q. K. Beg, M. Kapoor, L. Mahajan, G. S. Hoondal, Appl Microbiol Biotechnol (2001), Microbial xylanases and their industrial applications: a review.

[http://www.cazy.org/fam/acc\\_GH.html](http://www.cazy.org/fam/acc_GH.html)

Lee Y. E., Lowe S. E., Zeikus J. G. (1992). Regulation and Characterization of Xylanolytic Enzymes of *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* B6A-R1. Applied and Environmental Microbiology

Zeng H., Xue Y., Peng T., Shao W. (2007). Properties of xylanolytic enzyme system in bifidobacteria and their effects on the utilization of xylooligosaccharides. Food Chemistry 101

Uffen R. L. (1997). Xylan degradation: a glimpse at microbial diversity. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 19

Borneman WS, Ljungdahl LG, Hartley RD, Akin DE. (1991). Isolation and characterization of p-coumaroyl esterase from the anaerobic fungus *Neocallimastix* strain MC-2. Appl Environ Microb.

Coutinho P.M., Henrissat B. (1999). Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach. Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering

Crepin VF, Faulds CB, Connerton IF. (2004a). Functional classification of the microbial feruloyl esterases. Appl Microbiol Biot.

Crepin VF, Faulds CB, Connerton IF. (2004b). Identification of a type-D feruloyl esterase from *Neurospora crassa*. Appl Microbiol Biot.

Faulds C.B., Williamson G. Feruloyl esterases (2003). In: Whitaker JR, Voragen AGJ, Wong DWS. editors. Handbook of Food Enzymology: New York and Basel; Marcel Dekker

Faulds CB, Williamson G. (1991). The purification and characterisation of 4-hydroxy-3methoxycinnamic (ferulic) acid esterase from *Streptomyces olivochromogenes*. J Gen Microbio

Kroon PA, Faulds CB, Brezillon C, Williamson G. (1997). Methyl phenylalkanoates as substrates to probe the active sites of esterases. Eur J Biochem.

Moukouli M., Topakas E., Christakopoulos P. (2008). Cloning, characterization and functional expression of an alkalitolerant type C feruloyl esterase from *Fusarium oxysporum*. *Applied Microbiol. Biotechnol.*

Williamson G, Faulds CB, Kroon PA. (1998b). Specificity of ferulic acid (feruloyl) esterases *Biochem Soc T.*

Williamson G, Kroon PA, Faulds CB. (1998a). Hairy plant polysaccharides: a close shave with microbial esterases. *Microbiology.*

Topakas E., Stamatis H., Biely P., Kekos D., Macris B.J and Christakopoulos P. (2003a). Purification and characterization of a feruloyl esterase from *Fusarium oxysporum* catalyzing esterification of phenolic acids in ternary water–organic solvent mixtures. *J. Biotech.*

Pannala R, Razaq R, Halliwell B, Singh S, Rice-Evans CA (1998). Inhibition of peroxynitrite dependent tyrosine nitration by hydroxycinnamates: nitration or electron donation. *Free Radical Bio Med.*

Schroeter H, Williams RJ, Matin R, Iversen L, Rice-Evans CA (2000). Phenolic antioxidants attenuate neuronal cell death following uptake of oxidized low-density lipoprotein. *Free Radical Bio Med.*

Kanski J, Aksenova M, Stoyanova A, Butterfield DA. (2002). Ferulic acid antioxidant protection against hydroxyl and peroxy radical oxidation in synaptosomal and neuronal cell culture systems in vitro: structureactivity studies. *J Nutr Biochem.*

Record E, Asther M, Sigoillot C, Pages S, Punt PJ, Delattre M, Haon M, van den Hondel CAMJJ, Sigoillot J-C, Lesage-Meessen L, Asther M. (2003). Overproduction of the *Aspergillus niger* feruloyl esterase for pulp bleaching application. *Appl Microbiol Biot.*

Sigoillot C, Camarero S, Vidal T, Record E, Asther M, Perez-Boada M, Martinez MJ, Sigoillot JC, Asther M, Colom JF, Martinez AT. (2005). Comparison of different fungal enzymes for bleaching high-quality paper pulps. *J Biotechnol*.

Tapin S, Sigoillot JC, Asther M, Petit-Conil M. (2006). Feruloyl esterase utilization for simultaneous processing of nonwood plants into phenolic compounds and pulp fibers. *J Agr Food Chem*.

Tabka MG, Gimbert IH, Monod F, Asther M, Sigoillot JC. (2006). Enzymatic saccharification of wheat straw for bioethanol production by a combined cellulose xylanase and feruloyl esterase treatment. *Enzyme Microb Tech*.

Yu P, Mcnmon JJ, Maenz DD, Olkowski AA, Racz VJ, Christensen DA. (2003). Enzymic release of reducing sugars from oat hulls by cellulase, as influenced by *Aspergillus* ferulic acid esterase and *Trichoderma* xylanase. *J Agr Food Chem*.

Saha BC. (2003). Hemicellulose bioconversion. *J Ind Microbiol Biot*.

Sorensen HR, Meyer AS, Pedersen S. (2003). Enzymatic hydrolysis of watersoluble wheat arabinoxylan. 1. Synergy between  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases, endo-1,4- $\beta$ -xylanases, and  $\beta$ -xylosidase activities. *Biotechnol Bioeng*.

Yu P, McKinnon JJ, Christensen DA. (2005a). Hydroxycinnamic acids and ferulic acid esterase in relation to biodegradation of complex plant cell walls. *Can J Anim Sci*.

Yu P, McKinon JJ, Christansen DA. (2005b). Improving the nutritinional value of oat hulls for ruminant animals with pretreatment of a multi-enzyme cocktail: in vitro studies. *J Anim Sci*.

Chen J, Fales SL, Varga GA, Royse DJ. (1995). Biodegradation of cell wall components of maize stover colonized by white-rot fungi and resulting impact on in vitro digestibility. *J Sci Food Agr*.

Gruppen H, Kormelink FJM, Voragen AGJ. (1993). Enzymic degradation of water-unextractable cell wall material and arabinoxylan from wheat flour. *J Cereal Sci.*

Hoseney RC, Faubion JM. (1981). A mechanism for the oxidative gelation of wheat flour water soluble pentosans. *Cereal Chem.*

Ohashi, R. et al. (1999) A mini-scale mass production and separation system for secretory heterologous proteins by perfusion culture of recombinant *Pichia pastoris* using a shaken ceramic membrane flask. *J. Biosci. Bioeng.*

Villatte, F. et al. (2000) Expression level of heterologous proteins in *Pichia pastoris* is influenced by flask design. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*